

**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO**  
**Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques**

\*\*\*\*\*

**Département des Eaux et Forêts**

**THESE DE DOCTORAT**  
**EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

\*\*\*\*\*

Diversité génétique, physiologie de reproduction et étude  
d'impact de la fragmentation sur *Dalbergia monticola* de la  
forêt orientale de Madagascar

Présenté par :  
**ANDRIANOELINA ANDRIANAIVO Olivarimbola**

le 13 février 2009

Devant le jury composé de :

Président	: Pr RANDRIAMBOAVONJY Jean Chrysostome
Directeur de thèse	: Pr RAMAMONJISOA Lolona
Rapporteur interne	: Pr RAJOELISON Gabrielle
Rapporteur externe	: Pr BOUVET Jean Marc
Examineur	: Pr RAMAVOVOLOLONA
Examineur	: Pr RAZANAKA Samuel

## **REMERCIEMENTS**

\*\*\*\*\*

**Au début de cette thèse, je tiens à adresser mes vifs remerciements à toutes les personnes et les organismes qui ont concouru à l'élaboration de cette thèse:**

- *Professeur RANDRIAMBOAVONJY Jean Chrysostome, Enseignant à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Département des Eaux et Forêts, qui a accepté de présider le jury de cette soutenance,*
- *Professeur RAMAMOMJISOA Lolona, Directeur du Silo National des Graines Forestières, mon Directeur de thèse, qui a consacré beaucoup de temps pour le suivi de près de la réalisation de ces travaux de recherche,*
- *Professeur BOUVET Jean Marc, Directeur de l'unité de recherche « Diversité et amélioration des espèces forestières » du CIRAD, qui m'a encadré dans l'étude de la diversité génétique pour cette recherche, et dans la publication internationale des résultats et qui a accepté d'être le rapporteur de cette thèse,*
- *Professeur RAJOELISOA Gabrielle, Enseignante à l'Ecole Supérieure des Sciences agronomiques, Département des Eaux et Forêts, qui malgré ses lourdes occupations, a pris du temps pour lire et analyser ce document et a accepté d'être le rapporteur de cette thèse,*
- *Professeur RAMAVOVOLOLONA, Enseignante à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, qui m'a accepté d'être parmi les membres de jury de cette soutenance,*
- *Professeur RAZANAKA Samuel, Chercheur au Centre National de Recherches sur l'Environnement, qui m'a fait l'honneur de participer au jury de cette soutenance.*

**J'adresse aussi mes remerciements** à Monsieur le Professeur RASOARAHONA Jean, Directeur de l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, qui m'a accordé son autorisation pour la soutenance de cette thèse.

Toute ma reconnaissance vient également aux membres de la commission de thèse à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques d'avoir bien voulu examiner et agréer mon dossier de soutenance.

**Mes profonds remerciements vont également :**

- *Aux Responsables du CIRAD pour l'appui technique et financier sur les travaux de laboratoire de biologie moléculaire à Montpellier et à Madagascar par le projet FOREAIM,*
- *Aux Responsables du Projet Millenium Seed Bank en partenariat avec le SNGF, qui a aussi financé les travaux de réalisation de cette thèse, qui m'a bénéficié d'un stage de formation sur la physiologie de graine au laboratoire de graines à Wakehurst Place.*

**J'associe mes remerciements pour leurs conseils pendant la réalisation de ces travaux à :**

- *Mr Moctar Sacandé, coordinateur du Projet Millenium Seed Bank à Madagascar,*
- *Mr Danthu Pascal du Cirad Forêt à Madagascar*

- *Mr Randrianjafy Honoré, Chef du Département de Recherche Forestière et Piscicole du Fofifa.*

**Je remercie aussi** *Monsieur RAKOTONDRANONY Laurent Guy, ex Directeur du Silo National des Graines Forestières, qui était parmi les personnes qui m'ont encouragé à faire ce travail de thèse.*

Les travaux de laboratoire à Montpellier et à Madagascar ont été réalisés avec l'appui des personnes suivants : *Mr Vaillant Alexandre, Mlle Favreau Benedicte, Mr Leong Pock Tsi Jean Michel, merci à vous !*

**Je remercie également** *les stagiaires du Cirad Montpellier : Mlle Boiset Marine, Mr Nunez Philipe et Mr Rakotondraaelina Hery qui ont contribué pour l'avancement des travaux.*

**J'adresse aussi mes remerciements** à *Mr Rabevohitra Raymond pour son appui à l'identification de certains spécimens de Dalbergia*

**Que les personnes suivantes trouvent ici mes profondes reconnaissances :**

- *Tous les grimpeurs du SNGF qui ont apporté beaucoup leurs efforts lors de la collecte d'herbier et des graines,*

- *Tous les guides locaux : Jeannot, Zazah, Solo, Zavason, qui nous ont conduit dans les forêts pour la recherche des pieds rares de Dalbergia monticola,*

- *Tout le personnel du SNGF qui m'a encouragé durant les lourds travaux,*

*Que mes parents et ma famille reçoivent ici tous nos vifs remerciements pour leur encouragement et leur soutien durant la réalisation de cette thèse, que la grâce de Dieu soit avec vous.*

*Remerciement particulier à ma femme et mes trois fils **Tahina, Fana et Itokiana**, qu'ils reçoivent ici toute ma tendresse en maigre compensation par rapport à mes absences répétées qu'ils ont subies.*

*Mes respectueuses reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.*

**AAO**

## RESUME

\*\*\*\*\*

A Madagascar, les ressources génétiques de palissandre en particulier du *Dalbergia monticola* originaire de la forêt dense humide de moyenne altitude sont très menacées par les différentes formes d'exploitation. La gestion des ressources génétiques résiduelles est donc indispensable et urgente. Dans cette étude, la diversité génétique à différentes échelles, la physiologie de germination et de croissance juvénile de l'espèce ont été étudiées afin d'apporter des connaissances pour la gestion durable des ressources génétiques restantes.

L'étude de la diversité génétique à l'échelle de l'aire naturelle de *Dalbergia monticola* par combinaison des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques a permis de connaître la variabilité et l'impact des activités humaines sur cette diversité au niveau des populations et sous populations étudiées. Ces dernières ont présenté des valeurs importantes en terme d'hétérozygotie attendue et semble correspondre à celles observées dans des populations non encore exploitées. Malgré cela, la structure de cette diversité génétique est faible due généralement au régime de reproduction de l'espèce. Globalement, cette structure dans l'aire de distribution naturelle est aussi caractérisée par la différence entre les populations du Nord et celles du Sud.

Face à la fragmentation des forêts de la zone de distribution de *Dalbergia monticola*, l'effet de goulot démographique (bottleneck récent) caractéristique des forêts fragmentées n'est pas encore marqué pour les populations de l'espèce.

L'étude de la physiologie de graines, de la germination et de la croissance juvénile de *Dalbergia monticola* indique l'importance de la variabilité intra et inter provenance de la morphologie des graines à cause des facteurs écologiques et de l'état de couverture de la forêt.

Avec une température optimale située entre 20 à 25°C pour *Dalbergia monticola*, ce qui correspond à celle de l'origine écologique de l'espèce, le taux de germination peut atteindre 100% au bout de 5 à 6 jours en moyenne.

La première phase de croissance juvénile en pépinière des plantules indique une croissance en hauteur de 6 à 8 cm à l'âge de 3 mois. Parmi les différents caractères de développement juvéniles de l'espèce, la hauteur totale est très héritable. Et l'étude de corrélation entre les caractères a montré une liaison forte entre la hauteur totale et la hauteur de l'hypocotyle.

Etant donné que *Dalbergia monticola* a encore un niveau élevé de diversité dans son aire naturelle de distribution, une mesure de gestion locale est nécessaire pour permettre une gestion rationnelle des reliquats de son patrimoine génétique. Il s'agit par exemple de la sauvegarde de la variabilité *in situ* des populations selon les quatre grandes régions (Nord, Centre Nord, Centre et Sud) en gardant un nombre suffisant d'arbres reproducteurs dans les parcelles d'exploitation forestière. La conservation *ex situ* en complément de l'approche *in situ* peut être considérée en développant la conservation des graines (banque de gènes) et par la création des parcelles conservatoire vu l'importance du taux de germination des graines et la facilité d'adaptation des plantules en stade juvénile. Par ailleurs, *Dalbergia monticola* se prête à une multiplication par bouturage selon les résultats antérieurs de recherche.

Mots clés : *Dalbergia monticola*, diversité génétique, fragmentation, germination, croissance juvénile

## ABSTRACT

\*\*\*\*\*

In Madagascar, the genetic resources of rose wood in particular *Dalbergia monticola*, from humid dense forest of medium altitude are very threatened by various forms of exploitation and aggravation of the clearing. The residual genetic management is thus essential and urgent. In this study, genetic diversity on various scales, physiology of germination and the first phase of juvenile growth of the species were studied in order to bring knowledge for the sustainable management of the remaining genetic resources.

The study of genetic diversity on the natural range scale of *Dalbergia monticola* with the chloroplast and nuclear microsatellites markers allowed to know variability and impact of human activities on the level of the study's populations and under populations. It has presented important values in term of heterozygosity excepted and seems to correspond to those observed in not yet overexploited populations. In spite of that, the structure of this genetic diversity is weak due generally on the reproduction regime of the species. Overall, this structure in the natural distribution range is also characterized by the difference between the populations of North and those of the South.

Facing the forests fragmentation on the distribution range of *Dalbergia monticola*, the effect of recent bottleneck characteristic of fragmented forests is not yet marked for the populations of the species.

The study of seed physiology, germination and juvenile growth of *Dalbergia monticola* indicates the importance of intra and inter provenance variability for seeds morphology due to the ecological factors and the state of forest cover.

With an optimal temperature located between 20 at 25°C for *Dalbergia monticola*, which would correspond at the ecological origin of the species, the germination rate can on average reach 100% after 5 to 6 days. Thus the minimal temperature being situated between 10 and 15°C indicates the possibility of sowing lasting the winter period for the species.

The first phase of juvenile growth in seedbed indicates a speed of growth from 6 to 8 cm height at the 3 months age. For the species, among the different characters of juvenile development, the total height is very heritable. And the study of correlation between the characters has showed a strong connection between the total height and height of the hypocotyls.

Seeing that *Dalbergia monticola* has still high level of diversity in its natural distribution range, a measurement of local management is necessary to allow a rational management of the genetic resources. It is for example about the safe guard of in situ variability of the populations through the four great areas (North, Centre Northern, Centre and South) by creating protected zones and while keeping from a sufficient number of the reproductive trees in the pieces of forestry logging. The conservation ex situ can be considered as complement of in situ approach by developing the seeds conservation (genebank) or creation of conservatory plots considering the importance of the seeds germination and the adaptation facility of the seedlings in youthful stage. Moreover, *Dalbergia monticola* goes along with a multiplication by cuttings according to previous results of research.

Key words: *Dalbergia monticola*, genetic diversity, fragmentation, germination, juvenile growth.

## TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b><u>1<sup>ère</sup> partie : Contexte et problématique.....</u></b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I : Contexte général.....</b>	<b>3</b>
I.1- Madagascar : biodiversité unique au monde.....	3
I.2- Contexte de la gestion des ressources phytogénétiques forestières.....	4
<b>Chapitre II : Problématique.....</b>	<b>5</b>
II.1- Problématique globale.....	5
II.2- Menace sur les ressources phytogénétiques forestières malgaches.....	5
II.3- Les <i>Dalbergia</i> malgaches : espèces importantes sur le plan économique mais menacées par les pratiques humaines.....	6
<b>Chapitre III : Objectifs, hypothèses et méthodologie.....</b>	<b>8</b>
III.1- Objectifs.....	8
III.2- Hypothèses.....	9
III.3 - Méthodologie .....	9
<b>Chapitre IV : Etat des connaissances .....</b>	<b>11</b>
IV.1- Caractéristiques de la forêt dense humide de moyenne altitude (écosystème de <i>Dalbergia monticola</i> ).....	11
IV.2- Généralités sur le genre <i>Dalbergia</i> .....	11
IV.2.1- <i>Dalbergia spp</i> .....	11
IV.2.2- <i>Dalbergia monticola</i> .....	12
IV.3- Les apports des méthodes et outils de la génétique .....	16
IV.4- Technique de multiplication : outils de gestion des ressources phytogénétiques forestières....	17
IV.5- Revue bibliographique : impact de la fragmentation et de l'exploitation des forêts sur les ressources phytogénétiques forestières.....	17
<b><u>2<sup>ème</sup> partie : Matériels et méthodes.....</u></b>	<b>21</b>
<b>Chapitre V: Matériels d'étude .....</b>	<b>21</b>
V.1.- Sites et populations d'étude .....	21
V.1.1- Choix des sites .....	21
V.1.2- Caractéristiques des sites .....	21
V.1.3- Description des populations .....	24
V.2- Structures spatiales des individus .....	25
<b>Chapitre VI : Méthodes d'étude.....</b>	<b>30</b>
VI.1- Etude de la diversité génétique sur la base des marqueurs moléculaires .....	30
VI.1.1- Mode d'échantillonnage .....	30
VI.1.2- Collectes des échantillons des feuilles.....	30
VI.1.3- Analyse par marqueur moléculaire.....	31
VI.2- Etude de la diversité de physiologie de germination.....	41
VI.2.1- Mode de récolte des graines.....	41

VI.2.2- Caractérisation des graines.....	42
VI.2.3- Analyse statistique des données.....	44
VI.3- Etude de la diversité de croissance juvénile.....	45
VI.3.1- Mode d'essai.....	45
VI.3.2- Analyses statistiques des résultats .....	46
<b>3<sup>ème</sup> partie : Résultats et interprétations .....</b>	<b>49</b>
<b>Chapitre VII : Diversité par approche moléculaire .....</b>	<b>49</b>
VII.1- Etude de la diversité génétique à l'échelle de l'aire naturelle .....	49
VII.1.1- Diversité intra et inter populations .....	49
<i>VII.1.1.1- Selon les marqueurs microsatellites nucléaires.....</i>	<i>49</i>
<i>VII.1.1.2- Selon les marqueurs microsatellites chloroplastiques.....</i>	<i>51</i>
VII.1.2- Gradient de diversité.....	54
VII.1.3- Structure de la diversité génétique .....	54
<i>VII.1.3.1- Structure par marqueurs microsatellites nucléaires.....</i>	<i>55</i>
<i>VII.1.3.2- Structure par marqueurs microsatellites chloroplastiques.....</i>	<i>57</i>
VII.2- Isolement génétique par la distance .....	58
VII.3- Analyse des effets de goulots démographiques.....	58
VII.4- Structure de la diversité génétique à l'échelle du paysage .....	59
VII.4.1- Population de Ranomafana .....	59
VII.4.2- Population de Bekorakaka .....	64
VII.5- Spatialisation la diversité génétique à l'échelle locale .....	67
<b>Chapitre VIII : Diversité de la physiologie de germination et de croissance juvénile .....</b>	<b>69</b>
VIII.1- Variabilité intra et inter provenance de la morphologie et de l'anatomie de graines .....	69
VIII.1.1- Diversité morphologique des graines .....	69
VIII.1.2- Diversité anatomique des graines .....	72
VIII.2- Variabilité intra et inter provenance du taux de germination .....	75
VIII.2.1- Germination en fonction de la température .....	76
VIII.2.2- Germination en fonction de la teneur en eau .....	78
VIII.2.3- Corrélation entre le taux de germination et la qualité physiologique des graines.....	80
VIII.2.4- Corrélation entre la taille des arbres mères et le taux de germination.....	80
VIII.3- Paramètres étudiés de la croissance juvénile .....	82
VIII.3.1- Variabilité et héritabilité des caractères .....	82
VIII.3.2- Corrélation des caractères .....	86
VIII.3.3- Mortalité au stade juvénile .....	90
<b>4<sup>ème</sup> partie : Discussions et recommandations.....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre IX : Discussions.....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre X : Recommandations.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>104</b>
<b>Annexes</b>	

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE I : Caractéristiques phénotypiques des individus étudiés

ANNEXE II : Technique d'extraction d'ADN

ANNEXE III : Caractéristiques des arbres semenciers

ANNEXE IV : Protocole et conditions de manipulation du séquenceur

ANNEXE V : Modèle des résultats bruts de l'analyse de variance sur XLSTAT-Pro

ANNEXE VI : Protocole d'essai sur la caractérisation des graines, la germination et la croissance juvénile des plants

ANNEXE VII : Résultats par provenance d'analyse de variance et héritabilité des caractères

ANNEXE VIII : Exemple des résultats d'étude de diversité génétique par marqueur microsatellite nucléaire

ANNEXE IX : Résultats d'analyse de variance pour test de l'effet de fragmentation sur les paramètres de diversité obtenus des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques

ANNEXE X : Les différentes formes de graines de 6 espèces de *Dalbergia*

ANNEXE XI : Articles publiés et en cours sur l'étude de *Dalbergia monticola*

- **Article 1:** Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar ; in Biodiversity and Conservation (2006)
- **Article 2:** Characterization of microsatellite markers in the rosewood *Dalbergia monticola* Bosser & R. Rabev.) ; in Molecular Ecology Notes (2007)
- **Article 3:** Small effect of fragmentation detected by chloroplast and nuclear microsatellites on the genetic diversity of *Dalbergia monticola* Bosser & R.Rabev., an endangered tree species of the Madagascar oriental forest - Soumis à Annals of Botany



## LISTE DES TABLEAUX

	Page
<b><u>Tableau n°1</u></b> : Caractéristiques des sites d'étude.....	22
<b><u>Tableau n°2</u></b> : Répartition et effectif par population et sous population.....	24
<b><u>Tableau n°3</u></b> : nombre d'individus échantillonnés .....	41
<b><u>Tableau n°4</u></b> : : Diversité génétiques par marqueurs microsatellites .....	50
<b><u>Tableau n°5</u></b> : Paramètres de diversité génétique obtenus des marqueurs moléculaires chloroplastiques .....	52
<b><u>Tableau n°6</u></b> : Matrice de Fst par paire de populations.....	55
<b><u>Tableau n°7</u></b> : Résultats obtenus sur Wilcoxon's sign-rank test.....	58
<b><u>Tableau n°8</u></b> : Estimation des paramètres génétiques de cohortes pour la population et sous populations de Ranomafana.....	60
<b><u>Tableau n°9</u></b> : Nombre des migrants entre les sous populations à Ranomafana .....	63
<b><u>Tableau n°10</u></b> : Estimation des paramètres génétiques de cohortes de la population et sous populations de Bekorakaka.....	64
<b><u>Tableau n°11</u></b> : Nombre des migrants entre les sous populations à Bekorakaka.....	67
<b><u>Tableau n°12</u></b> : Valeurs des coefficients de kinship entre des individus pour deux classes de distance .....	68
<b><u>Tableau n°13</u></b> : Résultats des tests d'analyse de variance des caractères dimensions de graines.....	70
<b><u>Tableau n°14</u></b> : Résultats des tests d'analyse de variance du caractère poids de graines.....	70
<b><u>Tableau n°15</u></b> : Résultats de « cutting test ».....	73
<b><u>Tableau n°16</u></b> : Résultats d'analyse de la teneur en eau.....	75
<b><u>Tableau n°17</u></b> : Résultats d'analyse de variance inter provenances du taux de germination moyen..	77
<b><u>Tableau n°18</u></b> : Taux de germination en fonction de la teneur en eau (à 25°C).....	79
<b><u>Tableau n°19</u></b> : Résultats d'analyse de variance et d'héritabilité des caractères .....	83
<b><u>Tableau n°20</u></b> : Résultats d'analyse de variance entre les deux provenances .....	85
<b><u>Tableau n°21</u></b> : Matrice de corrélation (Pearson) pour Bekorakaka.....	87
<b><u>Tableau n°22</u></b> : Matrice de corrélation (Pearson) des caractères pour Ranomafana.....	89
<b><u>Tableau n°23</u></b> : Taux de mortalité observé pour chaque provenance.....	90

**LISTE DES FIGURES**

	Page
<b><u>Figure n°1</u></b> : Schéma de la méthodologie de recherche.....	10
<b><u>Figure n°2</u></b> : Répartition des chlorotypes dans les différentes échantillonnées.....	53
<b><u>Figure n°3</u></b> : Structure de l'arbre de Neighbor-Joining à partir des données nucléaires.....	56
<b><u>Figure n°4</u></b> : Structure de l'arbre de Neighbor-Joining à partir des données chloroplastiques .....	57
<b><u>Figure n°5</u></b> : Histogramme des coefficients de membership pour la population de Ranomafana .....	61
<b><u>Figure n°6</u></b> : Histogramme des probabilités d'appartenance des individus pour la population de Ranomafana.....	61
<b><u>Figure n°7</u></b> : Histogramme des probabilités associées au nombre de clusters inférés .....	62
<b><u>Figure n°8</u></b> : Histogramme des coefficients de membership pour la population de Bekorakaka.....	65
<b><u>Figure n°9</u></b> : Histogramme des probabilités associées au nombre de clusters inférés (Modèle D-spatial 200 000 itérations, K=1 à 7, 163 individus, 8 loci) .....	66

**LISTE DES GRAPHIQUES**

	Page
<b><u>Graphique n°1</u></b> : Répartition spatiale des individus des sous populations de Bekorakaka.....	27
<b><u>Graphique n°2</u></b> : Répartition spatiale des individus des sous populations à Ranomafana.....	29
<b><u>Graphique n°3</u></b> : Distribution globale des arbres semenciers pour la forêt de Bekorakaka.....	42
<b><u>Graphique n°4</u></b> : Distribution globale des arbres semenciers pour la forêt de Ranomafana.....	42
<b><u>Graphique n°5</u></b> : Gradient de l'indice de raréfaction en fonction de la distance en latitude.....	54
<b><u>Graphique n°6</u></b> : Distribution spatiale des clusters inférés par le modèle D-spatial de GENELAND .	63
<b><u>Graphique n°7</u></b> : Droite de régression linéaire entre la dimension (longueur et largeur) et le poids des graines (cas de Bekorakaka).....	71
<b><u>Graphique n°8</u></b> : Droite de régression linéaire entre la dimension (longueur et largeur) et le poids des graines (cas de Ranomafana)	72
<b><u>Graphique n°9</u></b> : Droite de régression linéaire entre longueur des graines et cutting test.....	74
<b><u>Graphique n°10</u></b> : Droite de régression linéaire entre largeur des graines et cutting test.....	74
<b><u>Graphique n°11</u></b> : Variation du taux de germination en fonction de la température.....	76
<b><u>Graphique n°12</u></b> : Variation moyenne du taux de germination pour les deux provenances (Bekorakaka et Ranomafana).....	77
<b><u>Graphique n°13</u></b> : Droite de régression linéaire entre teneur en eau et taux de germination de graines	79

<b>Graphique n°14</b> : Droite de régression linéaire entre les taux de germination de graines et les pourcentage de cutting test.....	80
<b>Graphique n°15</b> : Droite de régression linéaire entre les taux de germination de graines et la taille des arbres mères à Bekorakaka.....	81
<b>Graphique n°16</b> : Droite de régression linéaire entre les taux de germination de graines et la taille des arbres mères à Ranomafana.....	81
<b>Graphique n°17</b> : Droite de régression linéaire entre hauteur des arbres mères à Bekorakaka et hauteur des descendants.....	82
<b>Graphique n°18</b> : Droite de régression linéaire entre hauteur des arbres mères à Ranomafana et hauteur des descendants.....	84

### LISTE DES PHOTOS

	Page
<b>Photo n°1</b> : Aspect des défrichements dans la forêt de Bekorakaka.....	6
<b>Photo n°2</b> : Bois de <i>Dalbergia monticola</i> exploités dans le forêt de Fierenana Moramanga.....	7
<b>Photo n°3</b> : Aspects d'un arbre de <i>Dalbergia monticola</i> (Bossier et Rabevohitra).....	14
<b>Photo n°4</b> : Aspects des feuilles, fleurs et fruits de <i>Dalbergia monticola</i> (Bossier et Rabevohitra).....	15
<b>Photo n°5</b> : Aspects des fruits (gosses) et des graines de <i>Dalbergia monticola</i> .....	15
<b>Photo n°6</b> : Aspect des forets exploitées à Bekorakaka .....	26
<b>Photo n°7</b> : Aspects de la forêt de Ranomafana.....	28
<b>Photo n°8</b> : Collecte des feuilles à partir d'une branche(cas d'arbre isolé à Bekorakaka).....	31
<b>Photo n°9</b> : Lors du dépôt des produits d'amplification dans le séquenceur LICOR-IR2 .....	33
<b>Photo n°10</b> : Photos de gel obtenu après lecture par le séquenceur LICOR IR2.....	33
<b>Photo n°11</b> : Essai de germination dans un incubateur à 20°C.....	44
<b>Photo n°12</b> : Modèle de mesure de la hauteur totale du plant de <i>Dalbergia monticola</i> .....	45
<b>Photo n°13</b> : Vue d'ensemble de la croissance des plantules de <i>Dalbergia monticola</i> en pépinière...	46
<b>Photo n°14</b> : Variabilité morphologique des graines de <i>Dalbergia monticola</i> .....	69

### LISTE DES CARTES

	Page
<b>Carte n°1</b> : Aire de distribution de <i>Dalbergia monticola</i> .....	13
<b>Carte n°2</b> : Localisation des sites.....	21

## ABREVIATIONS

- ADN : Acide DesoxyriboNucléique
- ANGAP : Association National pour la Gestion des Aires Protégées
- DEA : Diplôme d'Etude Approfondie
- DEF : Direction des Eaux et Forêts
- DHP : Diamètre à la hauteur de poitrine
- ESSA : Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques
- (Fis, Fit, Fst) : indice de fixation de Wright
- He : Hétérozygotie entendue
- Ho : Hétérozygotie observée
- HT : Hauteur totale
- Hhyp : Hauteur de l'hypocotyle
- IUCN : International Union for Conservation of Nature
- IEFN : Inventaire Ecologique et Forestier National
- MEF : Ministère des Eaux et Forêts
- Na : Nombre d'allèles
- NFE : Nombre des feuilles
- NFO : Nombre de folioles
- PEI, PEII, PEIII : Programmes Environnementaux I, II et III
- PNAE : Plan National 'Action Environnemental
- PNSGRPF : Plan National Stratégique pour la Gestion des Ressources Phytogénétiques Forestières
- PCR : Polymérisation Reaction Chain
- (R) : Richesse allélique
- RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
- SNGDB : Stratégie National de la Gestion Durable de la Biodiversité
- SNGF : Silo National des Graines Forestières
- TMG : Temps moyens de germination

## INTRODUCTION

Au niveau mondial, la grande menace qui pèse sur l'environnement est actuellement le réchauffement de la planète. Cela est dû à plusieurs interventions humaines au niveau de différents écosystèmes (forêts, mers, océans, massifs montagneux, etc.). Concernant les zones forestières, les habitats des ressources génétiques de la région tropicale subissent depuis longtemps des dégradations. La superficie et la richesse des forêts sont réduites et entraînent une certaine disparition de la diversité génétique tant au niveau végétal qu'animal. Selon Whitmore et Sayer 1992, Oldfield 1988, la destruction des forêts tropicales (dont la superficie occupe 7% de la superficie totale des terres) est la plus importante destruction potentielle de la diversité biologique.

A Madagascar, ce phénomène se manifeste par la disparition des centaines de milliers d'hectares de forêts et de couvertures végétales chaque année par les feux de brousse, les tavy et les différentes formes d'exploitation. Cette disparition entraîne des effets sur la topographie et le climat de l'île, d'où l'aggravation de l'érosion suivie par une perturbation de régime hydrique et une déstabilisation du principal support de culture qu'est le sol. Pour le cas de la zone orientale, la réduction continue des forêts constitue un des problèmes de conservation de la biodiversité malgache. Cela conduit à la fragmentation forestière et à la diminution de taille des populations d'arbres qui peuvent entraîner à la réduction de la variabilité génétique par perte de certains gènes.

Pour les ressources génétiques de palissandre dont le bois est très demandé tant à Madagascar qu'à l'étranger, l'exploitation est très intense vu sa valeur technologique intéressante. Comme la régénération ne suit pas ce rythme d'exploitation, le patrimoine du genre *Dalbergia* est donc très menacé bien que plusieurs espèces soient connues et réparties à Madagascar. Cet aspect concerne *Dalbergia monticola*, une des espèces de palissandre très exploitée de la forêt dense humide de moyenne altitude. Les bois de cette espèce sont très recherchés car il présente des caractéristiques intéressantes par rapport à certaines espèces de palissandre. C'est pourquoi, *Dalbergia monticola* est considéré depuis une décennie comme vulnérable sur la liste rouge de l'International Union for Conservation of Nature (Du Puy, IUCN, 1998). La réduction de la densité des populations et la disparition de certains gènes sont donc considérables pour l'espèce.

Face à ces différents phénomènes, des stratégies et actions sont conçues au niveau locale, régional et national. C'est ainsi que le concept de gestion durable a été érigé. Mais pour ce faire, la connaissance de la diversité génétique est une étape indispensable. Les premiers moyens de description et de mesure de cette diversité génétique ont été réalisés à partir des caractères phénotypiques (morphologiques ou agronomiques). Mais ces derniers sont soumis à une variation continue, à des interactions avec les facteurs du milieu.

Alors depuis une vingtaine d'années, grâce à l'évolution de la biologie moléculaire, l'étude de la variabilité génétique pour certaines plantes peut s'effectuer à l'aide de marqueurs proches du génome qui ne sont pas soumis aux effets de l'environnement. A part la connaissance sur la diversité génétique, la régénération des espèces demande à être maîtrisée afin de pérenniser les ressources. La reproduction à partir de la graine reste la plus pratiquée dans ce domaine.

Les trois volets de cette étude considèrent ces différents aspects : la diversité génétique de l'espèce à l'échelle de l'aire naturelle et à l'échelle locale, la physiologie de germination et la première phase de croissance des plants en milieu *ex situ*. Par la suite, les résultats ont été utilisés pour voir les liaisons entre ces trois éléments étudiés dans le cadre de la gestion des ressources phytogénétiques forestières de l'espèce en question

Pour l'analyse de la diversité génétique, les marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques ont été utilisés pour connaître les différents paramètres permettant d'évaluer le niveau de variabilité génétique de *Dalbergia monticola*. Ils donnent des informations sur la structure de la variabilité et permettent de retracer les flux de gènes par graines à l'échelle de l'aire naturelle.

Les objectifs, les hypothèses et la méthodologie de cette recherche sont définis dans la première partie après le développement du contexte et du cadre de problématique liés au thème de l'étude.

La dernière partie apporte des discussions sur l'impact de la fragmentation et de l'exploitation sur la diversité génétique et la dynamique de cette dernière dans l'aire naturelle de *Dalbergia monticola*. Elle évoque aussi la variabilité adaptative des graines et des plants au niveau de la physiologie de germination et la croissance juvénile de l'espèce. L'exploitabilité des acquis de cette recherche dans la gestion durable des ressources de l'espèce sera présentée en terme de recommandation avant la conclusion finale de l'étude.

## **1<sup>ère</sup> partie : Contexte et problématique**

### **Chapitre I : Contexte général**

#### **I.1- Madagascar : biodiversité unique au monde**

La biodiversité malgache est reconnue dans le monde par sa richesse et son niveau d'endémisme très particulier. Elle est l'un des très rares endroits où des espèces nouvelles sont encore découvertes même parmi les oiseaux et les mammifères- (Mediaterrée, 2006). Elle figure parmi les 10 hot spots de la diversité biologique mondiale (Planète vivante, 2008) et possède l'un des écosystèmes les plus riches du monde. Des différenciations très remarquables sont observées sur les espèces tant au niveau végétal qu'animal. Cela est caractérisé par une diversité écologique importante : du climat, de la topographie, des habitats, etc.). Ces niveaux élevés d'endémisme et d'archaïsme des espèces sont expliqués par une longue évolution car au fil du temps, l'île est devenue un refuge exceptionnel pour les descendants d'espèces archaïques maintenant disparues des continents africain et asiatique avec lesquels elle était reliée à certaines périodes de son histoire géologique. Beaucoup d'espèces animales et végétales de la biodiversité malgache font actuellement partie des grandes priorités mondiales en matière de conservation de la biodiversité et de préservation de l'environnement.

Concernant les écosystèmes forestiers à Madagascar, ces derniers abritent particulièrement une biodiversité très large. Par ailleurs, les forêts sont de différents types et permettent un développement de large gamme d'espèces animales et végétales dont nombreuses sont endémiques. A Madagascar, les principales formations primaires d'écosystèmes forestiers sont repartis comme suit selon Moat, dans Atlas 2007 :

- les forêts denses humides sempervirentes de basse et moyenne altitude de l'Est occupant 4 773 700 hectares
- les forêts denses sèches décidues réparties sur les massifs de la partie Ouest et moyennes Ouest de Madagascar sur une superficie de 3 197 000 ha
- les forêts denses sclérophylles de moyenne altitude de la partie occidentale de l'île près de 540 000 ha;
- les forêts littorales occupant 34 600 ha
- les fourrés denses xérophiles de la région méridionale présentant les espèces épineuses sur une superficie de 1 835 500 ha,
- les mangroves sur le long des zones littorales de la côte Ouest de Madagascar ayant une superficie de 243 300 ha.

L'estimation de richesse floristique à Madagascar est près de 12000 espèces, répartis sur 1600 genres et appartenant à 180 familles (Guillaumet, 1984). Les formations primaires abritent encore de bois précieux et d'essences tropicales rares.

## **I.2- Contexte de la gestion des ressources phytogénétiques forestières**

Depuis des dizaines d'années, conscient des problèmes de dégradation accrue de l'environnement et la perte de biodiversité ainsi que les problèmes issus des différents cataclysmes naturels, Madagascar s'est engagé dans la protection de son environnement depuis la fin des années 1980. Vers 1989, le gouvernement a élaboré son Plan National d'Action Environnemental (PNAE). La Charte de l'Environnement était adoptée sous forme de loi d'Etat, la loi 90-033 qui constitue le cadre général d'exécution de la Politique Nationale de l'Environnement. Elle comporte les objectifs visés, la stratégie à mettre en oeuvre et les trois Programmes Environnementaux (PEI, PEII et PEIII). La PNE vise à rétablir un équilibre durable et harmonieux entre les besoins de développement de l'homme et les ressources écologiques.

Plusieurs conventions internationales ont été signées et/ou ratifiées par Madagascar pour la sécurité et la gestion durable de sa biodiversité : la Convention sur la Diversité Biologique, le Protocole sur la Biosécurité, la Convention sur le Commerce International des espèces de faune et Flore sauvage menacées d'extinction, entre autres. Suite à ces acquis au niveau international, les objectifs de la Stratégie National de la Gestion Durable de la Biodiversité à Madagascar ont été basés sur ceux de la Convention sur la Diversité Biologique. Cela indique la combinaison de la conservation et de la valorisation d'une part, de l'écologie et de l'économie d'autre part pour garantir l'efficacité de la gestion (Minenv, 2002). Selon ce SNGDB, la conservation des ressources génétiques forestières, agricoles et animales a été définie parmi les axes d'orientation de cette stratégie. Concernant cette dernière, Madagascar a déjà établi un Plan National Stratégique de Gestion des ressources phytogénétiques forestières pour leur gestion durable (PNSGRPF), par l'initiative du SNGF et différentes institutions. Ce plan a été déjà mis en oeuvre depuis Janvier 2000. Il est basé sur sept axes stratégiques dont le premier axe a mis l'importance de la connaissance de la diversité génétique des espèces cibles pour point de départ d'une gestion rationnelle et durable des ressources phytogénétiques.



## **Chapitre II : Problématique**

### **II.1- Problématique globale**

La grande menace qui pèse sur l'environnement mondial est actuellement le réchauffement de la planète. Ce dernier affecte l'équilibre des grands écosystèmes : les massifs montagneux, les mers et les océans, les forêts et les zones tropicales. Le prolongement de la sécheresse, l'élévation du niveau des mers, la disparition des espèces de plantes et d'animaux sont tous des effets graves sur l'environnement.

Les activités humaines, l'utilisation de combustibles fossiles (pétrole, charbon) et la déforestation sont parmi les principales causes de la dégradation de l'environnement qui se traduit en particulier par l'augmentation excessive du taux de gaz carbonique dans l'atmosphère.

Pour Madagascar, la dégradation de ses diversités écologiques entraîne des menaces sur l'écologie et l'environnement du pays. La disparition des centaines de milliers d'hectares des forêts et des couvertures végétales par les feux de brousse et les tavy chaque année a des effets sur la topographie et le climat de l'île. D'où l'aggravation de l'érosion et de la formation de lavaka. Des changements climatiques au niveau de certaines zones ont été observés. Les pressions qui pèsent sur les différents écosystèmes, notamment sur les écosystèmes forestiers (22,6% de l'île), constituent des menaces pour la biodiversité faunistique et floristique. Par conséquent, ces écosystèmes perdent certaines de leurs composantes. En effet, certaines espèces sont en train de disparaître car leurs hôtes et/ou leur effectif sont détruits ou diminuent. Des érosions génétiques sont entraînées par des pertes d'individus et des gènes. Cela provoque une régression de la capacité d'adaptation et de reproduction des espèces et qui mène à leur extinction.

### **II.2- Menace sur les ressources phytogénétiques forestières malgaches**

Pour les pays tropicaux, les problèmes de dégradation de l'environnement concernent beaucoup les écosystèmes forestiers. Ces grandes richesses biologiques sont menacées d'une forte dégradation à tel point que plusieurs espèces risquent de disparaître définitivement, sans même avoir été découvertes.

La cause principale de dégradation des ressources forestières à Madagascar est due aux activités anthropiques. La grande partie des populations paysannes malgaches vivent encore sous la dépendance des produits de ressources naturelles. Par conséquent, le défrichement pour les cultures sur brûlis, la surexploitation de forêts sans mesures de préservation des ressources et les feux de brousse ou feux de pâturage non contrôlés sont parmi les principales pratiques dévastatrices de ces ressources.

Depuis la 2<sup>ème</sup> moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, la superficie forestière ne cesse pas de diminuer d'année en année. De 1960 à 1994, 5 millions d'hectares des forêts sont disparus dû à des

exploitations abusives (Charbonnier, 1998). Le taux de déforestation enregistré par l'administration forestière tourne autour de 117 453 ha par an entre 1992 et 1999 (DEF, 2002). Et selon Moat dans l'Atlas 2007, le taux de déboisement est d'environ 150 000 ha/an. Ce rythme implique la perturbation et la destruction de ces écosystèmes forestiers et entraîne la raréfaction ou la disparition totale de certaines espèces caractéristiques.

**Photo n°1** : Aspect de défrichements dans la forêt de Bekorakaka

(Forêt dense humide de moyenne altitude incluant l'aire de distribution de *D. monticola*)

### **II.3- Les *Dalbergia* malgaches : espèces importantes sur le plan économique mais menacées par les pratiques humaines**

#### **- Leur rôle économique**

Le genre *Dalbergia* figure parmi les bois très anciennement recherchés dans le commerce. Il est en 2<sup>ème</sup> catégorie dans la classification du bois. Le palissandre malgache, vu sa qualité et sa valeur technologique importante, est très demandé tant au niveau national qu'à l'étranger en tant que bois d'œuvre et en ébénisterie. Pour l'année 1999, la quantité exportée avoisinait 1050 m<sup>3</sup> correspondant à une valeur supérieure à 2 milliards francs fmg (DEF, 2002). Les chiffres obtenus au niveau des ports maritimes de Toamasina, Morondava et Mahajanga donnent une valeur totale près de 3200 m<sup>3</sup> concernant l'exportation de palissandre en 1999 (Rija A, Caroline I *et al*, 2001). Par conséquent, l'exploitation de bois de Palissandre est très intense et il y a des risques de pertes considérables au niveau des ressources génétiques de certaines espèces.

**- *Dalbergia monticola***

*Dalbergia monticola* est une des espèces de palissandre de la forêt dense humide de moyenne altitude de l'Est de Madagascar. Cette espèce est très exploitée car elle présente une taille et de qualité importante par rapport à certaines espèces de palissandre. La rareté des pieds de cette espèce est confirmée dans le rapport de stage d'Urs et Andrianaivo en janvier 2000. Cet arbre est considéré comme vulnérable sur la liste rouge de l'International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, Du Puy, 1998). Les pertes d'individus et de gènes et la stabilité de l'ensemble de la diversité biologique s'en trouvent donc menacées pour l'espèce. Des mesures de gestion des ressources résiduelles sont alors urgentes pour afin d'assurer leur pérennité et leur renouvellement.

L'étude antérieure effectuée (Andrianoelina, 2002) est déjà cadrée dans l'élaboration d'éléments de base de gestion de l'espèce en étudiant la diversité génétique globale de l'espèce dans son aire naturelle. Suite à cette étude, cette recherche a été menée dans l'objet d'approfondir l'analyse de la diversité génétique et sa dynamique face aux différentes pressions humaines. Cela permet de voir la capacité d'adaptation et de reproduction de l'espèce par la fragmentation et l'exploitation de la forêt. Le chapitre ci après représente les objectifs globaux de cette étude, les hypothèses à vérifier ainsi que la méthodologie suivie.

**Photo n°2** : Bois de *Dalbergia monticola* exploités dans la forêt de Fierenana Moramanga (2003)

## **Chapitre III: Objectifs, hypothèses et méthodologie**

### **III.1- Objectifs**

Dans le cadre de la gestion des ressources phytogénétiques forestières à Madagascar, cette étude est réalisée afin de fournir de nouvelles connaissances sur le genre *Dalbergia* des forêts dense humide de l'Est de Madagascar. Des objectifs globaux suivis des objectifs spécifiques ont été définis pour arriver à des suggestions et de conclusions précises pour la gestion durable de l'espèce *Dalbergia monticola* en question.

Objectif global 1 : Comprendre la dynamique spatio-temporelle de la diversité génétique en relation avec les événements historiques, l'impact de la fragmentation et de l'exploitation forestière

Les objectifs spécifiques suivant ont été définis pour atteindre cet objectif global :

- analyser la structuration génétique des populations à l'échelle de l'aire naturelle en faisant référence à l'état de fragmentation
- étudier la spatialisation de la diversité génétique à l'échelle du paysage (locale) ainsi qu'au sein des populations,
- quantifier les éventuels effets de goulot démographiques sur la diversité génétique,
- étudier les flux de gènes à l'intérieur des populations et entre elles

Objectif global 2 : Comprendre le déterminisme génétique de la physiologie des graines et des premiers stades de croissance des plants

Les objectifs spécifiques définis pour atteindre cet objectif sont :

- analyser la variabilité (inter et intra population et inter et intra provenance) de la cinétique de germination en séparant les effets génétiques des effets environnementaux
- étudier la variabilité de la croissance des jeunes plants (inter et intra population et inter et intra provenance) en séparant les effets génétiques des effets environnementaux
- connaître l'écologie et physiologie des graines de l'espèce afin de maîtriser la technique de multiplication voire la comparaison avec d'autres espèces

### **III.2- Hypothèses**

Les hypothèses suivantes sont à vérifier pour arriver à des conclusions précises dans cette recherche :

1- la structure de la diversité génétique de *Dalbergia monticola* est déterminée par les évènements historiques (la période de dernière glaciation) et des activités humaines,

2- la fragmentation de la forêt orientale a eu un impact sur la diversité génétique de *Dalbergia monticola* en accentuant les effets de dérive génétique et en réduisant la diversité au sein des populations,

3- la fragmentation et l'exploitation des forêts influencent la capacité de reproduction des semenciers (germination de leurs semences)

4- la germination et la croissance juvénile de *Dalbergia monticola* est sous l'influence génétique.

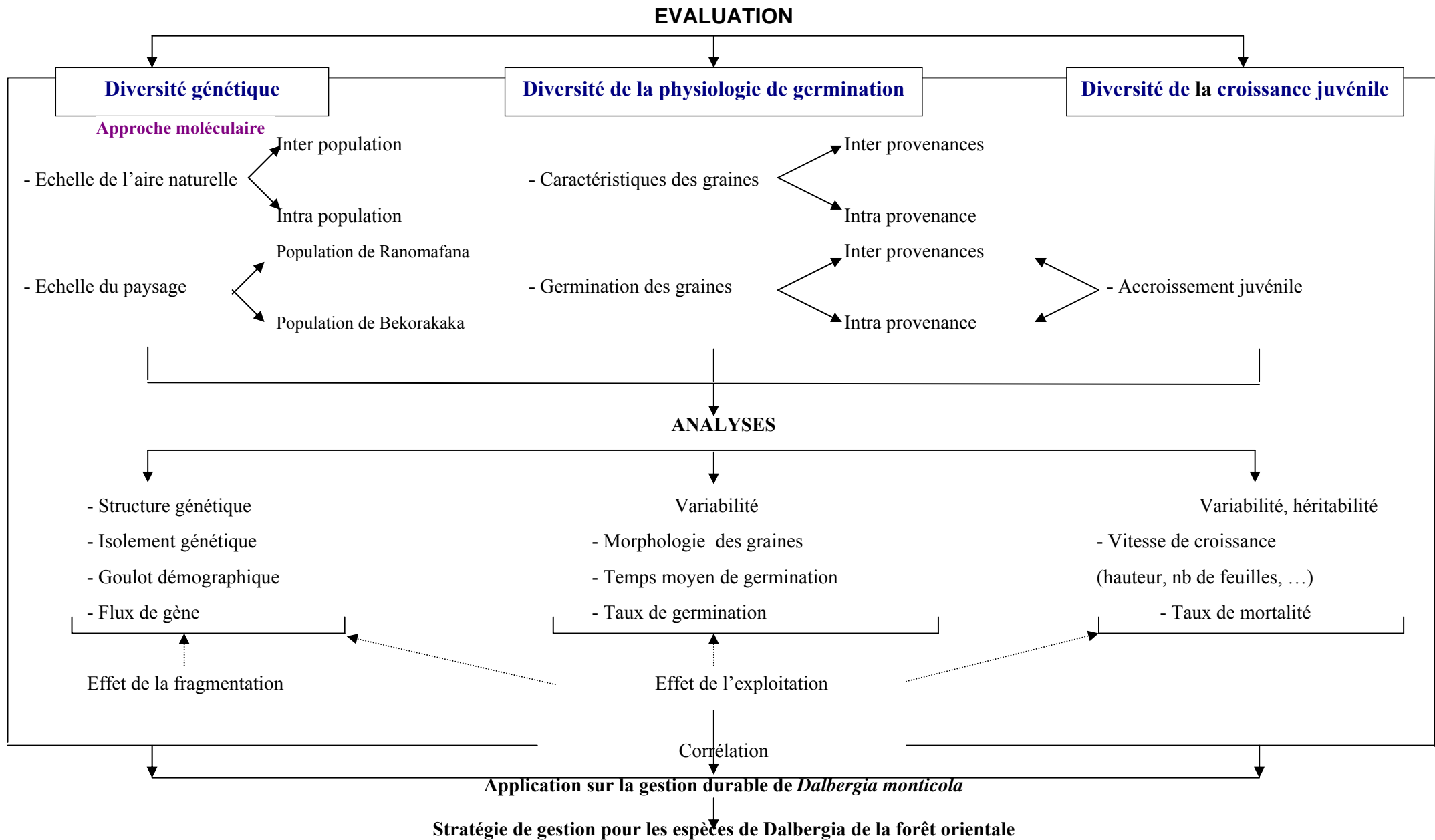
### **III.3- Méthodologie**

La méthodologie de recherche comprend deux grandes parties :

- la première partie concerne l'évaluation globale au niveau de la diversité génétique, de la physiologie de germination des graines et de la croissance juvénile des plants de l'espèce

- La deuxième partie est axée sur l'analyse des différents paramètres de diversité liés à différents facteurs influant sur ces trois niveaux

Le schéma suivant résume la démarche méthodologique de cette recherche.

**Figure 1** : Schéma de la méthodologie de recherche

## **Chapitre IV : Etat des connaissances**

### **IV.1- Caractéristiques de la forêt dense humide de moyenne altitude (écosystème de *Dalbergia monticola*)**

Les forêts denses humides sempervirentes de basse altitudes et de moyenne altitude colonisent les zones sub-littorales sur sable et/ou sur latérite, le long de l'escarpement de la falaise orientale ainsi que les massifs de la partie Nord de Madagascar tels que les montagnes de Tsaratanana, d'Ambre et de Marojejy et de la péninsule de Masoala. Selon Humbert (1965) la forêt dense humide de moyenne altitude se situe entre 800 à 1800 m. Depuis la forêt dense ombrophile de basse altitude, jusqu'à la forêt sclérophylle de montagne, il y a une transition continue pour le passage à de formation d'altitude. La forêt est bien dominante avec une strate supérieure de 20 à 30 m de hauteur d'arbres ramifiés assez bas, une strate moyenne de 1 à 15 m de haut et une strate de petits arbres dont la hauteur est de l'ordre de 5 m. Le sous bois est relativement encombré, avec essentiellement des plantes ligneuses. La flore épiphytique est d'une assez grande richesse (Koechlin, 1974) mais elle n'atteint pas son plein développement. Dans la strate supérieure, le genre *Weinmannia* et *Tambourissa* sont parmi les plus fréquents. D'après Humbert, (1965) les genres suivants sont remarqués dans la strate supérieure : *Symphonia*, *Dombeya*, *Dalbergia*, *Dilobeia*, *Canarium*, *Vernonia*, *Diospyros*, *Eugenia*, *Prothorus*, *Grewia*, *Brachyleana*.

Dans la strate moyenne, la fréquence des *Cyathea* et de *Pandanus* a été observée. La strate inférieure est dominée par plusieurs types d'espèces herbacées : des Graminées, Fougères, Euphorbiacées etc.

Mais la problématique qui pèse sur ces forêts depuis longtemps est le défrichement destiné à différentes cultures vivrières.

### **IV.2- Généralités sur le genre *Dalbergia***

#### **IV.2.1- *Dalbergia* spp**

Le genre *Dalbergia* appartient aux familles des légumineuses ou Fabaceae. Les espèces de *Dalbergia* ont des aspects différents : arbres, arbustes ou lianes. A Madagascar, 43 espèces sont décrites dont 42 sont endémiques (Bossier et Rabevohitra, 1996). Une seule espèce est une liane (*Dalbergia bracteolata*). Parmi les 43 décrites, 25 espèces donnent du bois de bonne qualité.

Actuellement, certaines espèces sont devenues rares dû à l'exploitation abusive comme *Dalbergia monticola*, *Dalbergia baronii* et *Dalbergia greveana* (Arnold et Andrianaivo, 2000) et aussi suite à la disparition de l'écosystème forestier par l'agriculture sur brûlis.

Concernant l'aire écologique, tous les domaines phytogéographiques de Madagascar présentent des espèces de *Dalbergia* sauf les zones à haute altitude.

#### IV.2.2- *Dalbergia monticola*

*Dalbergia monticola* est une des espèces de palissandre de la forêt dense humide de moyenne altitude de l'Est de Madagascar. Il était identifié par Bosser et Rabevohitra vers 1996 car auparavant l'espèce était mélangée avec le *Dalbergia baronii*. La forme des fruits et l'inflorescence terminale de l'arbre le différencient avec ce dernier. La racine de l'arbre forme des nodules en symbiose avec des rhizobiums (Rasolomampianina *et al*, 2005). Ainsi, avec cette symbiose pour la fixation de l'azote, *Dalbergia monticola* optimise la fertilité du sol.

##### a) Taxonomie

La systématique de l'espèce est résumée comme suit :

<u>Systématique</u>	<u>Classification</u>
Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement :	<i>Angiosperme</i>
Classe :	<i>Dicotyledones (Magnoliospida)</i>
Sous classe :	<i>Rosidaeae</i>
Ordre :	<i>Fabales</i>
Famille :	<i>Fabaceae (Leguminoseae)</i>
Sous famille :	<i>Faboideae</i>
Tribu :	<i>Dalbergieae</i>
Genre :	<i>Dalbergia</i>
Espèce :	<i>Dalbergia monticola</i> Bosser & Rabevohitra

Source : Bosser et Rabevohitra, 1996, Marques, 1986-2006 ;  
<http://www.tela-botanica.org/eflora/2006.01/nt/1155/synthese>

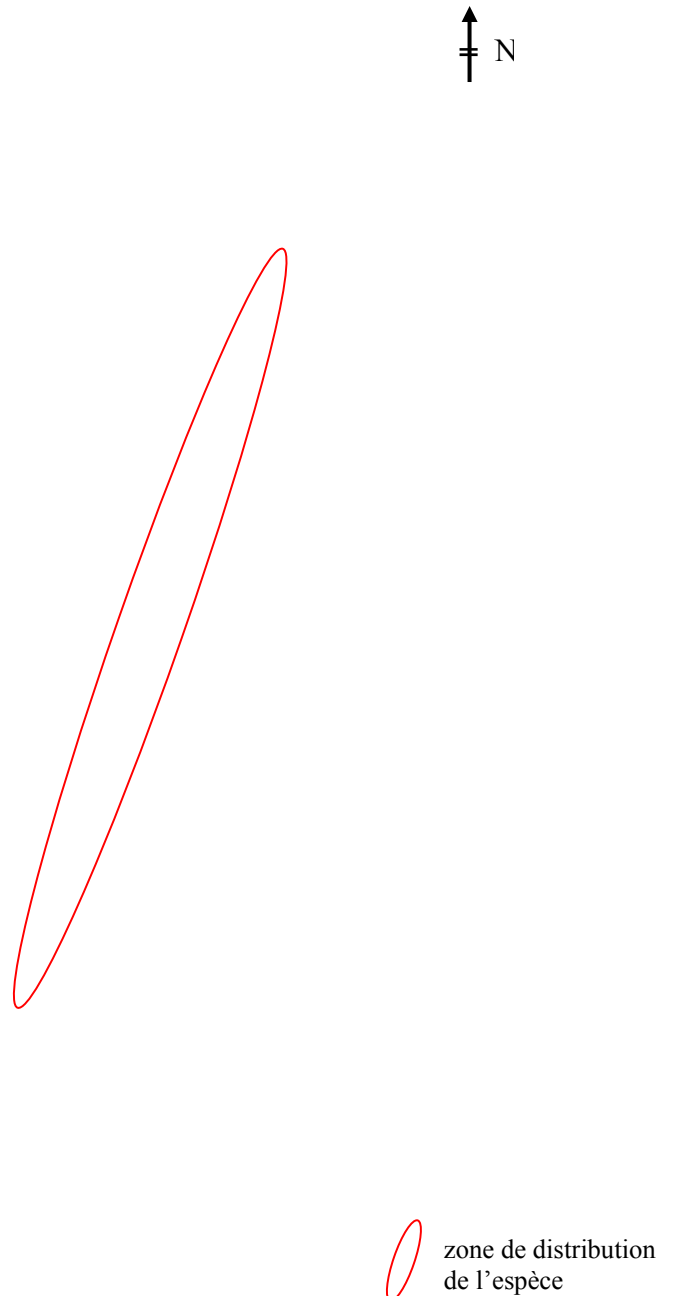
*Dalbergia* est connu sous le nom commercial "Palissandre". A Madagascar, *Dalbergia* est appelé Voamboana ou Manary. L'espèce *Dalbergia monticola* est connue sous différentes appellations : Voamboana (à Ankeniheny), Voamboana atin'akoho (à Ranomafana), Voamboana mavokely (à Didy), Hazovola (Andilamena).

Depuis l'élaboration du Plan stratégique de gestion des ressources phytogénétiques forestières à Madagascar en 2000, *Dalbergia monticola* était signalée parmi les espèces prioritaires compte tenu des importantes menaces sur les populations résiduelles. Le résultat de notre stage (année 2000) dans la mise en œuvre de ce plan confirme sa rareté. Il est classé parmi les *Dalbergia* présentant de taille importante.



*b) Aire de distribution*

L'aire naturelle de *Dalbergia monticola* s'étend sur le domaine oriental de moyenne altitude de Madagascar (altitude variant entre 500 et 1600 m). Elle s'étend jusqu'à Tolongoina et Fort Carnot au Sud et à Antalaha au Nord. Actuellement, dû à l'exploitation, il est difficile de trouver des arbres de grande taille pour cette espèce. La carte n°1 nous indique son aire de répartition.



**Carte n° 1** : Aire de distribution de *Dalbergia monticola*

*c) Caractéristiques botaniques et phénologiques de l'espèce*

C'est un arbre qui peut atteindre 20 à 30 m de hauteur et un diamètre jusqu'à 1 m. L'écorce est grisâtre et un peu écailleuse. Le bois a une couleur variable selon la taille : rose violacé et brun à violet. Sa qualité lourde et dure permet de l'utiliser à différents usages.

Les feuilles sont généralement caduques. Elles ont une longueur variant entre 3.5 - 12 cm; avec des folioles de 20 à 30 à limbes obovales à oblongues. Ces folioles sont très coriaces, arrondies et souvent un peu retuses au sommet, arrondies à la base. Elles sont glabres et luisantes sur la face supérieure et pubescentes blanchâtre à jaune pâle plus ou moins dense sur la face inférieure. Le pétiole et les pétiolules sont densément pubescents -hérissés.

**Photo n°3** : Aspect d'un arbre de *Dalbergia monticola*

Les inflorescences sont terminales, paniculiformes et parfois axillaires. Les axes, les rameaux et les pédicelles sont densément pubescents. Les fleurs sont blanches et ont une longueur de 4.5 à 6 mm.

Les fruits sont de couleur brune rougeâtre, d'une forme elliptique à oblongue et sont aigus ou atténués au sommet et cunéiformes à la base. Ils existent des mono-, di- et tri spermes. Les monospermes mesurent 3.5-4.5 x 1.3-1.5 cm, les dispermes ont une longueur de 6-7 cm et les trispermes sont 7-9 cm de long. Les graines sont sub-réniformes, de couleur brun rougeâtre.

La période de floraison se situe entre le mois d'août au mois de novembre et la fructification commence à partir de novembre jusqu'au mois de janvier.



**Photo n°4** : Aspects des feuilles, fleurs et fruits de *Dalbergia monticola* (Bossier et Rabevohitra, 1996)

**Photo n°5**: Aspects des fruits (gousses) et des graines de *Dalbergia monticola*

*c) La dissémination des pollens et des graines*

En général, dans les forêts naturelles, la pollinisation est assurée par différents agents pollinisateurs comme les insectes, le vent. D'après notre observation, les deux types de dissémination anémophile et entomophile y peuvent se rencontrer pour *Dalbergia monticola*.

Concernant les graines, le fait de trouver des régénérations et des fruits dans un périmètre proche de l'arbre (rayon de 10 à 20 m autour du pied de l'arbre) indique que le mode de dissémination est généralement barochore. Certains espèces de lémuriens consomment les graines d'après les observations des riverains, d'où la possibilité de zoochorie.

### **IV.3 - Les apports des méthodes et outils de la génétique**

La génétique des populations essaie d'étudier chez les êtres vivants la structure génétique et sa variation éventuelle d'une génération à l'autre sous la façon dont se fusionnent les gamètes d'une part et sous l'action de divers phénomènes tels que mutation, migration, sélection naturelle d'autre part. Dans le cadre de la gestion des ressources phytogénétiques, la connaissance des patrimoines génétiques à partir de ces outils de la génétique avance la stratégie de gestion. Pour le cas de la forêt qui constitue une grande population d'arbres, la stratégie de conservation et d'amélioration des arbres sont basés surtout sur la connaissance des ressources existantes tant au niveau quantitatif mais surtout qualitatif sur le plan génétique. Dans le programme de gestion et protection, la diversité génétique est reconnue comme une information fondamentale en vue de la mise au point de stratégies de conservation (Newton, 1999).

Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques de marqueurs moléculaires rend plus précis l'étude de la diversité génétique des espèces. Actuellement, les marqueurs génétiques sont largement utilisés pour estimer le polymorphisme et prédire l'évolution des populations végétales. L'avancée dans la connaissance du génome des plantes a favorisé le développement de marqueurs moléculaires ciblant une région de l'un des génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial. Le développement de la génomique donne accès aux gènes contrôlant des caractères adaptatifs, très importants pour la gestion des ressources génétiques.

La recherche de marqueurs moléculaires aide aussi le sélectionneur à mieux connaître la génétique des caractères importants afin d'optimiser l'efficacité des programmes de sélection. Ces marqueurs sont en effet très précieux car ils permettent de tester rapidement les variétés et de retenir celles qui possèdent les caractéristiques recherchées.

#### **IV.4 – Technique de multiplication : outils de gestion des ressources phytogénétiques forestières**

Les ressources phytogénétiques forestières doivent être reproduites avec des techniques appropriées afin de les pérenniser (MEF/SNGF, 2000). Cet aspect est très important dans la stratégie pour la gestion durable. Dans le cadre de développement et propagation des espèces, la maîtrise des techniques de multiplication joue un rôle important afin de les vulgariser. Ces techniques doivent être simples et adaptées afin que les villageois ou les acteurs de reboisement pourront les appliquer. Différents essais doivent être menés in et ex-situ pour y arriver. Suite à la maîtrise de technique, il y aura l'information, la formation et l'encadrement des collectivités et les acteurs sur les plantations et les soins sylvicoles nécessaires afin d'observer une dynamique de plantation. Dans le processus de gestion durable des ressources, la maîtrise de la manipulation des semences est une action non négligeable. Après les collectes, le traitement et l'entreposage temporaire des graines, des recherches sur le mode optimal de conservation des graines sont nécessaires. -

#### **IV.5- Revue bibliographique : impact de la fragmentation et de l'exploitation des forêts sur les ressources phytogénétiques forestières**

Cette revue bibliographique résume quelques résultats d'étude sur l'impact de la fragmentation et de l'exploitation sur la diversité génétique de certaines espèces importantes afin de situer la recherche dans le contexte au niveau mondial. Mais avant d'entrer dans cette partie, quelques notions générales sur la fragmentation de l'habitat et la fragmentation forestière sont présentées.

##### **- La fragmentation de l'habitat**

Un habitat est défini comme étant un élément du paysage, ou une série d'éléments, offrant les ressources nécessaires à la survie des individus d'une espèce, à leur reproduction et à leurs déplacements (Pereboom, 2006). La modification de l'habitat résulte, en général, non pas en une éradication complète de l'habitat original mais en une fragmentation de celui-ci en morceaux de l'habitat original distants les uns des autres. En biologie de la conservation le terme "fragmentation de l'habitat" signifie aussi bien la destruction d'un habitat et donc la réduction de sa superficie que le partitionnement qui en résulte (Noss & Csuti, 1997). La première conséquence de la fragmentation est la diminution de la superficie de l'habitat et donc la diminution de la capacité à pourvoir les ressources nécessaires de chaque morceau d'habitat résiduel, ce qui entraîne une diminution du nombre d'espèces ou d'individus par espèce (Douglas et al, 2000; Pimm et al., 1988). D'autre conséquence de la fragmentation de l'habitat est que chaque morceau d'habitat résiduel se trouve de plus en plus éloigné de son voisin et peut finir par se trouver complètement isolé s'il n'est pas relié aux autres par des corridors.

## **- La fragmentation forestière**

La fragmentation forestière désigne le morcellement de la forêt en îlots boisés. Elle est une principale forme de fragmentation de l'habitat. Elle a principalement un impact sur les mouvements des individus, ce qui peut avoir pour conséquences, notamment, une diminution de l'effectif des populations et un isolement des populations résiduelles (Pereboom, 2006). La principale forme d'altération de l'écosystème forestier est sa destruction directe, principalement par le défrichement. Caughley & Gunn (1996) expliquent que la diminution des effectifs fragilise les populations et peut mener à la disparition d'une espèce par différentes raisons. Par exemple, la disparition des petites populations sous l'effet des cataclysmes naturels, la perte de variation génétique due à la diminution des capacités de reproduction et/ou de survie des jeunes individus par des gènes délétères. Toutefois, la fragmentation peut aussi avoir pour conséquence d'accentuer l'effet de l'hétérogénéité du paysage sur la diversité génétique et comportementale des populations. L'hétérogénéité de l'habitat provoque des adaptations locales qui conduisent à une meilleure utilisation des ressources. La fragmentation a donc pour effet d'accentuer la diversité génétique inter populations, tout en diminuant la diversité génétique intra populations.

## **- Impact de la fragmentation et de l'exploitation des forêts sur la diversité et structure génétique**

### **- Cas d'une espèce de forêt tropicale humide**

La densité et la répartition spatiale des individus reproducteurs peuvent affecter l'organisation de la diversité génétique des populations d'arbres forestiers. Les espèces de forêts tropicales humides présentent souvent des densités faibles, des structures agrégées, et une grande variabilité diamétrique. L'exploitation diminue la densité et modifie les distributions spatiales des individus. Elle peut en conséquence avoir des effets sur la diversité génétique et sur la reproduction, paramètres essentiels de la conservation *in situ* des espèces. Selon l'étude effectuée par Lourmas (2005) en utilisant des marqueurs des microsatellites pour étudier la structure génétique d'une espèce africaine, *Entandrophragma cylindricum* (Meliaceae), sur deux dispositifs camerounais correspondant à trois situations : forêt primaire, forêt d'exploitation récente, forêt d'exploitation ancienne. Les trois populations présentent une diversité génétique élevée et un déficit en hétérozygotes équivalent. Les corrélations entre les structures spatiales des individus et des gènes ne jouent cependant qu'un rôle limité, le pollen se dispersant à grande distance. Le régime reproducteur, fortement allogame et le taux d'appareillement génétique dans la descendance sont indépendants de la densité des arbres reproducteurs.

### **- Cas d'une espèce néo tropicale**

Avec l'étude effectuée par Lemes *et al* (2003), le *Swietenia macrophylla*, Meliaceae ou Acajou est un arbre Néotropical d'Amérique du Sud le plus cher et beaucoup exploité. L'étude de la diversité génétique des sept populations naturelles séparées jusqu'à 2100 km dans l'ensemble de l'arc du sud du bassin de l'Amazonie Brésilienne. L'analyse effectuée avec huit sites microsatellites sur 194 individus adultes ont donné de diversité hautement variable, avec de nombre d'allèles variant de 13 à 17 (moyenne = 18.4). Les valeurs obtenues sont élevées pour toutes les populations (moyenne  $H_E = 0.781$ , varié entre 0.754–0.812). Quatre populations parmi les sept étudiées ont montré un coefficient de consanguinité significative. La découverte de la différenciation locale parmi les populations Amazoniennes mahogany souligne la nécessité pour la conservation *in situ* de plusieurs populations de *S. macrophylla* à travers sa distribution dans l'Amazonie Brésilienne.

### **- Cas d'espèce de conifère d'une grande île**

La fragmentation et la dégradation de l'habitat représentent la grande menace à long terme de la biodiversité globale (Saunders *et al*, 1996). La réduction de la taille de population et l'augmentation de l'isolement associé à la dégradation de l'habitat ont des conséquences démographique et génétique et mettent en danger les vestiges d'espèces de plante (Oostermeijer *et al*. 2003; Washitani *et al*. 2005). Concernant l'étude d'impact sur les espèces forestières, les premiers effets génétiques de la dégradation de l'habitat sont examinés sur le conifère. Pour le cas d'*Araucaria nemorosa*, espèce se trouvant à la Nouvelle Calédonie qui est très menacée. C'est une biodiversité globale « hotspot » où la meilleure concentration mondiale de l'espèce de conifère endémique coïncide avec le niveau extrêmement élevé de la destruction de l'habitat en raison du feu et des mines. En utilisant sept sites microsatellites, les estimations sont faites à partir de la variation du marquage génétique, les coefficients de consanguinité et la différenciation de population adulte. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives dans les paramètres génétiques entre les populations adultes dans toutes les populations. Toutefois, dans l'*A. nemorosa*, la cohorte juvénile démontrait une perte des rares allèles et des taux élevés de consanguinité quand elle est comparée à la cohorte adulte. Cela suggère que la dégradation environnementale récente est influencée par la structure génétique des populations *A. nemorosa* (Kettle *et al*, 2007)

### **- Effet de l'exploitation des espèces forestières selon quelques auteurs**

L'exploitation influence les processus normaux tels que le flux de gène, joignant le système, la dérive génétique, et la structure génétique spatiale, directement et indirectement (Kanashiro *et al.*, 2002). Elle réduit également la densité d'espèces d'arbre dans la population reproductrice qui cause l'augmentation de la distance entre les arbres reproducteurs. Par suite, elle peut également créer les sous populations dans lesquelles la capacité pour échanger le matériel génétique diminue. D'ailleurs,

l'exploitation cause des impacts sur les étapes préliminaires depuis l'origine et le développement d'une population comme l'important de nombre de plants juvéniles. Ainsi, des arbres non exploités peuvent être tués ou endommagés pendant ou après les opérations de collecte (Jennings et *al*, 2001). Les conséquences peuvent être négatives pour le succès de reproducteur et de flux de gène non seulement des arbres tropicaux mais également d'autres organismes (Nason et Hamrickm, 1997; Dayanandan et *al*, 1999).

L'étude comparant les effets de l'exploitation sélective sur la diversité génétique d'une population de *Carapa guianensis* en Amazonie brésilienne a observé la perte de quelques allèles rares, mais une absence des effets sur l'hétérozygotie observé et attendu (Cloutier et *al* 2007).

Selon Nason et Hamrickm (1997), la réponse de l'arbre à l'exploitation dépend des facteurs spécifiques à l'espèce qui peuvent influencer la connectivité génétique et les modèles reproducteurs entre les populations. Une réduction intense de la taille reproductrice de population a le potentiel de réduire les niveaux de la diversité génétique et par conséquent, affecte l'adaptation potentiel futur de l'espèce (Rajora et *al*, 2000; Glaubitz et *al*, 2003; Lowe et *al*, 2005). En plus, la réduction du nombre d'arbres reproducteurs peut affecter le mouvement de pollinisateur et donc la capacité de dispersion de pollen, qui pourrait causer une augmentation du taux d'autofécondation et de la consanguinité. Dans un certain cas, les arbres peuvent devenir isolé dans l'espace et génétiquement, probablement menant à l'extinction locale (Nason et Hamrickm, 1997).

### **- Effet de l'exploitation sélective de l'espèce tropicale**

L'exploitation de la forêt réduit la densité de population et peut causer la perte d'allèles. Cela affecte la diversité génétique et la structure génétique spatiale (SGS) et le flux de pollen de la population (Marivana et *al*, 2008). Ces facteurs ont été étudiés au niveau de l'espèce d'arbre *Bagassa guianensis* Aubl. La diversité génétique a été comparée parmi les régénérations, les juvéniles et les arbres d'adulte, avant et après l'exploitation sélective. L'étude a observé des différences non significatives entre ces échantillons. L'immigration de pollen des arbres en dehors de la parcelle de terrain, la longue distance de dispersion pollen, et le grand secteur de pollinisation de voisinage ont suggéré que l'espèce puisse s'adapter aux impacts de l'exploitation



## 2<sup>ème</sup> partie : Matériels et méthodes

### Chapitre V : Matériels d'étude

#### **V.1.- Sites et populations d'étude :**

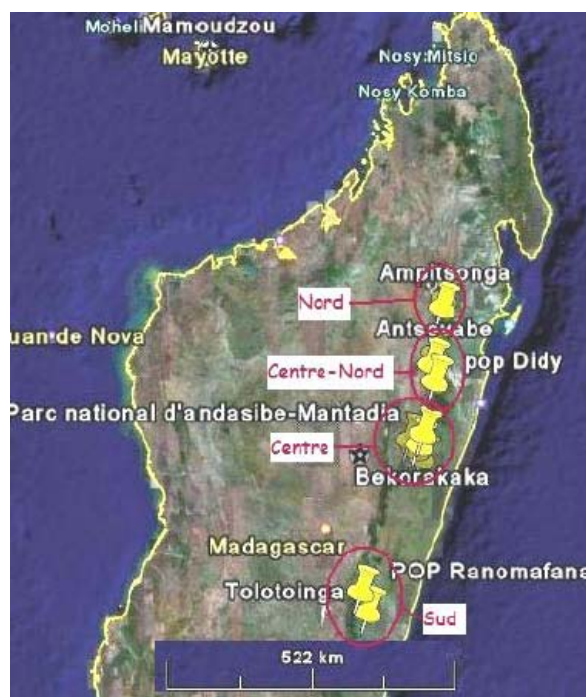
Les individus ont été échantillonnés à travers l'aire naturelle de *Dalbergia monticola*.

##### **V.1.1- Choix des sites**

Le but est de couvrir le maximum possible de toute l'aire naturelle de l'espèce pour mieux représenter la variabilité au niveau des provenances. Les sites sont identifiés à partir des documentations et des enquêtes préalables auprès des chercheurs et des responsables des services forestiers. La majorité des sites ont été déjà identifiés lors de notre étude en DEA. Durant cette présente étude, les 2 sites Ranomafana (aire protégée) et Bekorakaka (forêt exploitée) sont beaucoup représentées au niveau des échantillons pour mieux approfondir l'étude à l'échelle de paysage de la dynamique de la diversité génétique.

En général, les sites sont répartis en 4 zones:

- domaine du Nord : Ampitsongoina, Tsaramolotra
- domaine du Centre Nord : Didy, Ambohijanahary, Antsevabe
- domaine du Centre : Bekorakaka, Madiorano et Ankeniheny
- et domaine du Sud : Ranomafana et Tolongoina



**Carte n° 2** : Localisation des sites (Boisset , 2007)

##### **V.1.2- Caractéristiques des sites**

Les régions d'étude se situent dans la zone de moyenne altitude de Madagascar (situé entre 400 et 1500 m). Les caractéristiques des sites sont résumées dans le tableau n°1

**Tableau n°1** : Caractéristiques des sites d'étude

Domaine	Sites	Situation administrative	Situation géographique	Situation climatique (T° <sub>min</sub> , max ; P° <sub>m a</sub> )	Aspects pédologique	Statut de forêt	Source
	Tsaramolotra (Ts)	R : Alaotra Mangoro D : Andilamena C : Andilamena F : Behorefo St : Tsaramomlotra	Alt. : 900 – 1200 m Lat. : 16°57' Long : 48°44'	min : 12 °C ; max : 28 °C 750 mm environ	Sols ferrallitiques (argilo sableux)	Forêts classées (exploitée)	- Recueil d'information sur terrain - Génie Rurale Andilamena, 2001
	Ampitsongoina (Ap)	R : Alaotra Mangoro D : Andilamena C : Andilamena F : Sahavolo St : Ampitsongona	Alt. : 900 – 1250 m Lat. : 17°05' Long : 48°42'				
Centre Nord	Didy (Dd)	R : Alaotra Mangoro D : Ambatondrazaka C : Didy F : Anjohibe St : Anjohibe Didy	Alt. : 850 – 1200 m Lat. : 18°09' Long : 48°34'	min : 21 °C; max : 27,4 °C 1240 mm	Sols ferrallitiques (argilo sableux)	forêt classée d'Ambohilero (exploitée)	- Recueil d'information sur terrain - Limites et dynamique coutumières dans la forêt classée d'Ambohilero SE d'Ambatondrazaka, 1998
	Antsevabe (Ats)	R : Alaotra Mangoro D : Ambatondrazaka C : Antsevabe F : Antsevabe St : - Ambavala - Antsevabe	Alt. : 1050 – 1250 m Lat. : 17°59' Long : 48°32'				
	Ambohijanahary (Aj)	R : Alaotra Mangoro D : Ambatondrazaka C : Manakambahiny W F : Ambohijanahary St : Ambohijanahary	Alt. : 950 – 11200 m Lat. : 17°45' Long : 48°35'				

R : Région, D : District, C : Commune, F : Forêt, St : Site

T°<sub>min</sub> : Température minimale ; T°<sub>max</sub> : Température maximale

P°<sub>m a</sub> : Précipitation moyenne annuelle

Domaine	Sites	Situation administrative	Coordonnées géographiques	Données climatique (T° <sub>min, max</sub> , P° <sub>m a</sub> )	Aspects pédologique	Statut de forêt	Source
Centre	Bekorakaka (Bk)	R : Alaotra Mangoro D : Moramanga C : Lakato F : Manasamena St : Bekorakaka, Sandranjahana, Sahambaky	Alt. : 850 - 1100 m Lat. : 19°06' S - 19°20' S Long : 48°10' - 48°21' E	min : 10°C ; max : 26°C 1700 – 2200 mm	Sols ferrallitiques (argilo sableux)	Forêts classées (exploitée)	- Recueil d'information sur terrain - Schéma d'aménagement d'une forêt classée pilote en zone humide. Forêt d'Ankeniheny, 2000
	Ankeniheny (Ak)	R : Alaotra Mangoro D : Moramanga C : Anosibe an'Ala F : Ankeniheny St : - Ankeniheny, - Madiorano	Alt. 800 – 1100 m Lat : 19°02' S - 19°18' S Long : 48°12' E – 48°25' E				
	Andasibe (Md)	R : Alaotra Mangoro D : Moramanga C : Andasibe F : Andasibe St : - Mantadia, - Analamazaotra	Alt. 930 – 1080 m Lat : 18°49' - 18°56'S Long: 48°26' - 48°25'E	min : 10°C ; max : 26 - 27°C 1700 – 2200 mm 1700 mm	Sols ferrallitiques (argilo sableux)	Parc National	- Recueil d'information sur terrain - Internet : <a href="http://www.parcsmadagascar.com/mantadia">http://www.parcsmadagascar.com/mantadia</a>
Sud	Ranomafana (Rn)	R : Vatovavy Fitovinany D : Ifanadiana C : Ranomafana F : Ranomafana St : - Talatakely, - Vatolampy	Alt. : 943 m - Lat. : 21°16'30 S - Long : 47°26' E -	min : 14 °C ; max : 27,4 °C 2922,8 mm	Sols ferrallitiques (argilo sableux)	Parc National	- Recueil d'information sur terrain - Inventaire des légumineuses à nodosités dans le Parc National de Ranomafana, 1993
	Tolongoina	R : Vatovavy Fitovinany D : Ikongo C : Tolongoina F : Malazamasina St : Malazamasina Tolongoina	800 - 960 m Lat : 21°34'S Long : 47°32'E	min : 15 °C ; max : 27°C 2800 mm	Sols ferrallitiques (argilo sableux)	Forêt classée (exploitée)	- Recueil d'information sur terrain

### V.1.3- Description des populations

Dans les 4 zones de provenance, les arbres échantillonnés ont été classés en populations et sous populations. Cela a été défini à priori en fonction de leur emplacement administratif et géographique (voir carte n°2). La distance entre les sous populations varient de 3 à 15 km et celle entre les populations de 15 à 518 kilomètres. Les récoltes des échantillons ont été déjà commencées depuis l'étude antérieure effectuée (Andrianoelina, 2002).

L'effectif des sous populations varie de 9 à 121 individus. Cette différence était due à la faible densité des pieds trouvés dans chaque site. Mais cette variation d'effectif est bien considérée dans l'analyse des données.

**Tableau n°2:** Répartition et effectif par population et sous population

Domaine	Population	Sous populations	Effectif/ sous population	Total/ population	Niveau de perturbation
<b>Nord</b>	Tsaramolotra	Tsaramolotra	10	10	3
	Ampitsongona	Ampitsongona	9	9	3
<b>Centre-Nord</b>	Didy	Didy	13	33	3
		Valivona	20		2
	Anbohihahanary	Anbohihahanary	9	9	3
	Antsevabe	Antsevabe	11	17	3
		Ambavala	6		2
<b>Centre</b>	Ankeniheny	Madiorano	4	8	3
		Ankeniheny	4		3
	Bekorakaka	Sandra jahana	61	201	3
		Sahambaky	58		3
		Bekorakaka	56		3
		Ambodigoavy	8		
	Andasibe	Manasamena	18	30	3
		Analamazaotra	21		1
		Mantadia	9		1
<b>Sud</b>	Ranomafana	Mahatazana	26	207	2
		Talatakely	121		1
		Vatolampy	60		1
	Tolongoina	Tolongoina	18	18	2
Total	10	20	542		

(1) : forêt à faible perturbation (faiblement fragmentée, non exploitée)

(2) : forêt moyennement perturbée (moyennement fragmentée)

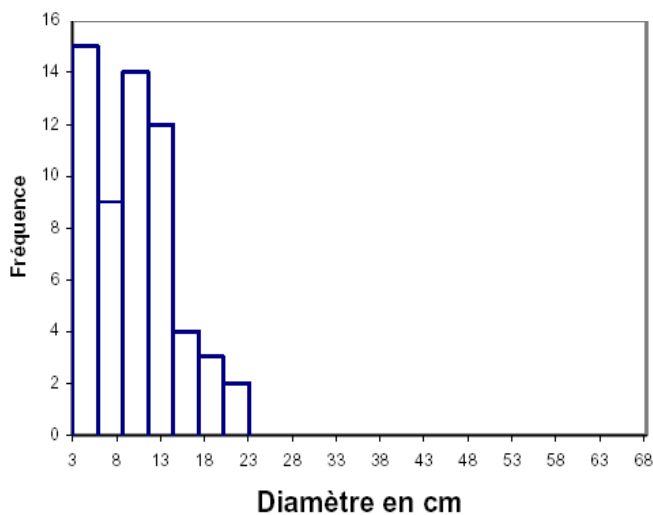
(3) : forêt très perturbée (fragmentée, très exploitée)

## V.2- Structures spatiales des individus

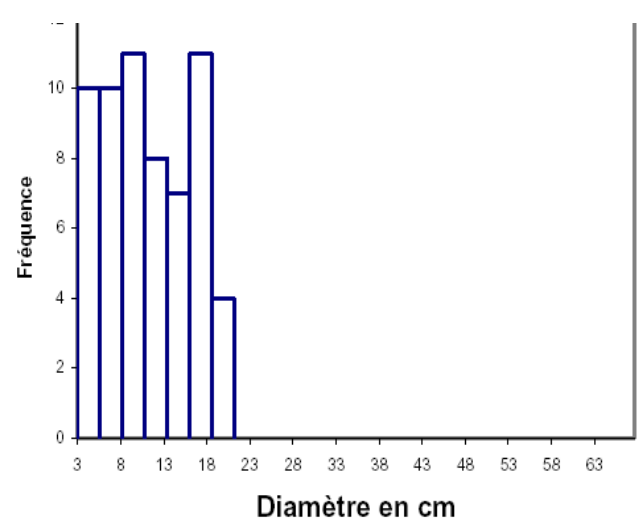
Cette partie représente la distribution diamétrique des sous populations de Bekorakaka et de Ranomafana qui seront étudiés dans l'étude à l'échelle paysage de la diversité génétique.

### Population de Bekorakaka

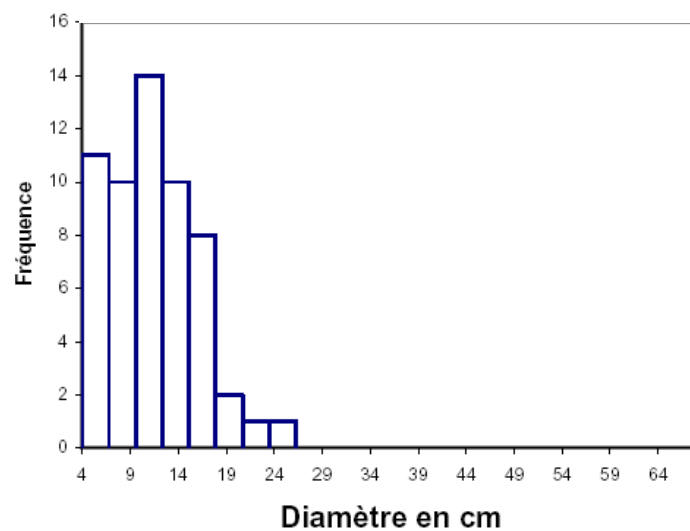
**Distribution en diamètre de la sous population de Bekorakaka**



**Distribution en diamètre de la sous population de Sandranjahana**

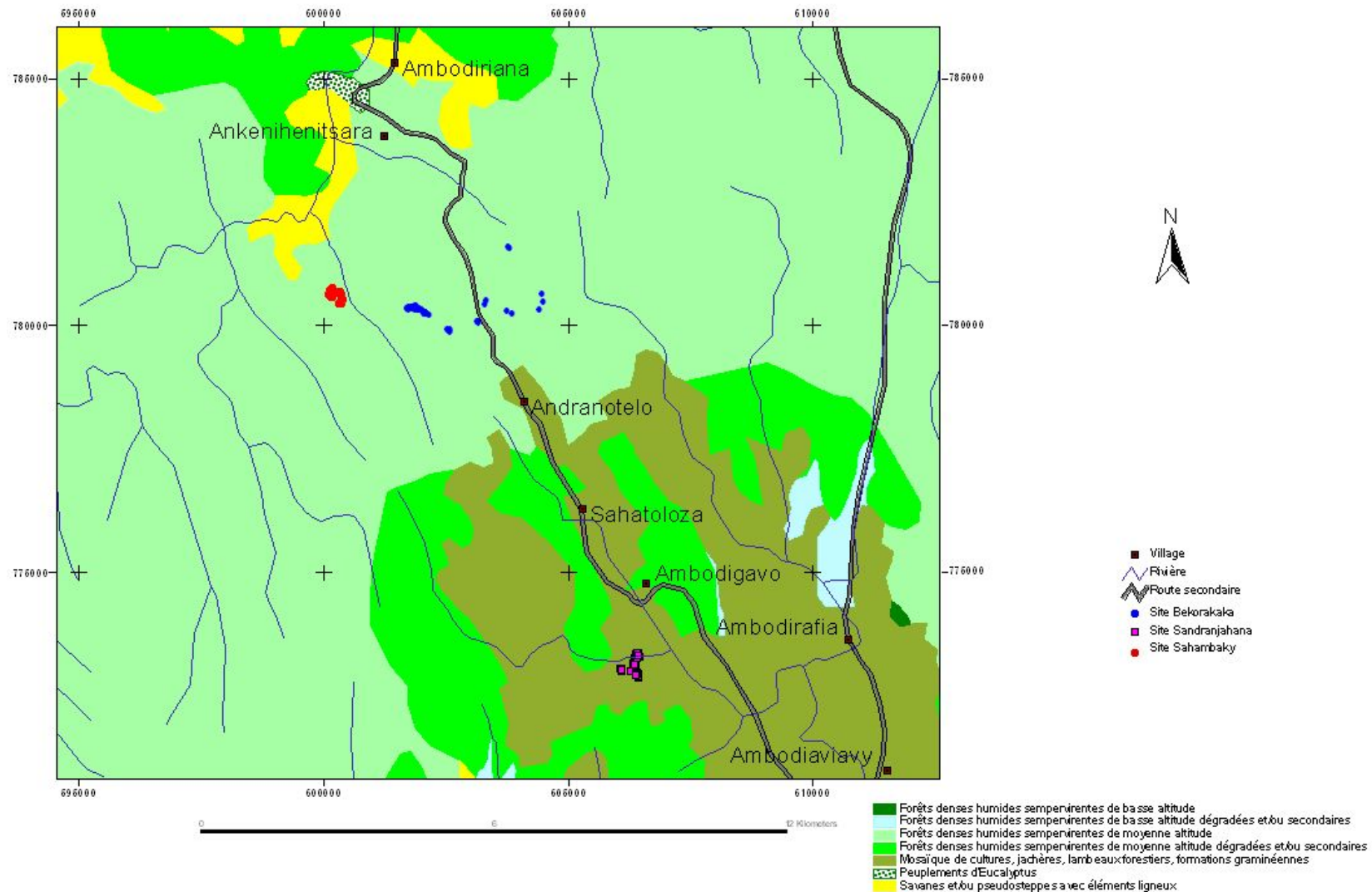


**Distribution en diamètre de la sous population de Sahambaky**



Les sous populations représentent un très faible effectif d'individus adultes.

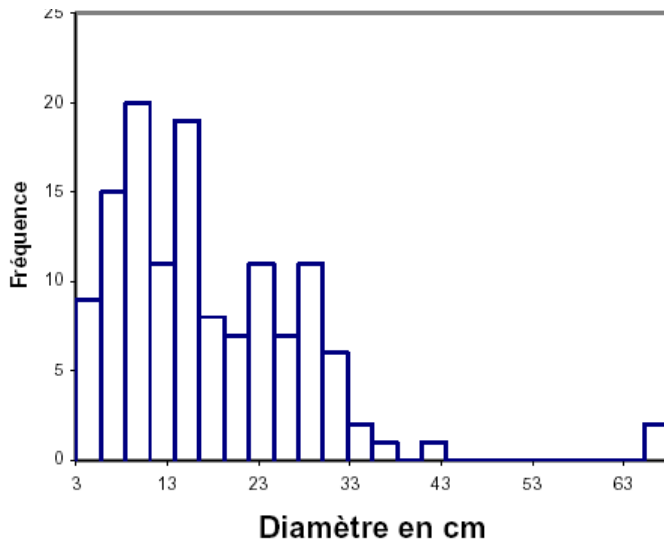
**Photo n°6** : Aspect des forêts exploitées à Bekorakaka



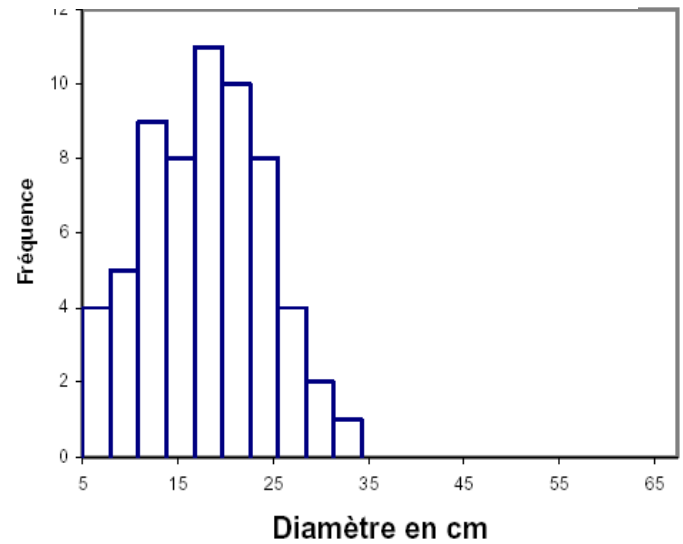
**Graphique n°1** : Répartition spatiale des individus des sous populations de Bekorakaka

## Population de Ranomafana

**Distribution en diamètre de la sous population de Ranomafana et Talatakely**



**Distribution en diamètre de la sous population de Vatolampy**

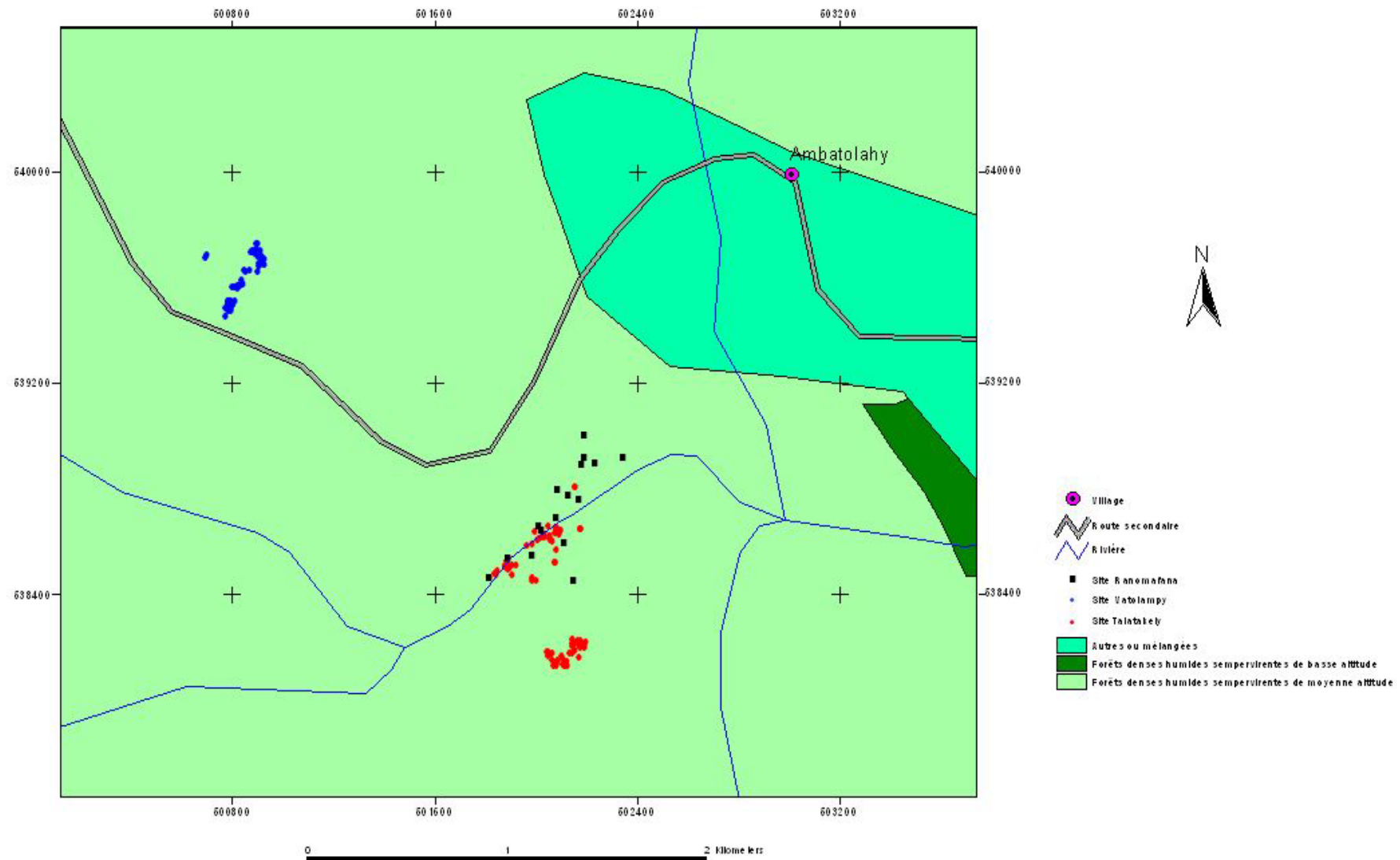


Le nombre d'individus adultes est faible dans les deux sous populations. La majorité est en stade de jeunesse.



**Photo n°7** : Aspect de la forêt du Parc National de Ranomafana





**Graphique n°2** : Répartition spatiale des individus des sous populations à Ranomafana

## **Chapitre VI : Méthodes d'étude**

Ce chapitre concerne les différentes méthodes utilisées (techniques, analytiques et statistiques) lors de l'étude de la diversité génétique, de la variabilité de germination et de croissance des plants.

### **VI.1- Etude de la diversité génétique sur la base des marqueurs moléculaires**

L'étude de la diversité génétique a été menée par approche moléculaire. Le marqueur multiallélique microsatellites a été utilisé dans cette étude de diversité génétique selon la catégorisation de Grivet et Noyer, 1999. Il s'agit de microsatellites nucléaires et de microsatellites chloroplastiques qui permettent de révéler une série de plusieurs allèles pour chaque locus étudié. Les deux marqueurs ont été testés pour mieux expliciter la structure de la diversité génétique et les flux de gènes au sein et entre les populations.

#### **VI.1.1 - Mode d'échantillonnage**

Dans les 10 populations étudiées, selon les caractéristiques des sites, des sous populations ont été identifiées. La collecte des feuilles a été effectuée sur les trois différentes strates : adulte, jeune, régénération (DHP > 20 cm, 10 < DHP < 20 cm et DHP < 10 cm). Mais dû à la rareté des pieds de l'espèce, l'objectif de 20 à 30 individus par strate par sous population n'a pas été atteint. La superficie d'échantillonnage varie de 5 à 15 ha selon la taille des sous populations et la présence des pieds dans chaque site.

La méthode par transect suivant les principes du Rapid Assessment Programm (RAP) a été appliquée pour la récolte des échantillons. La base de cette méthode est d'échantillonner un nombre fixe de plantes pour toute zone plutôt que de prendre une aire type (ESSA, 1996). La longueur du transect est variable et dépend de la distance à partir de laquelle on arrive à rencontrer le nombre d'individus fixés. Selon la topographie du milieu, on a choisi une direction et la recherche des pieds de *Dalbergia monticola* a été effectuée dans un rayon de 10 à 15 m par transect (20 X 20m). La distance entre deux individus consécutifs trouvés est très variable. Elle est située entre 2 à 500 m. Le nombre des échantillons par site dépend aussi du nombre des pieds trouvés (cf tableau 2)

#### **VI.1.2- Collectes des échantillons de feuilles**

Pour les espèces forestières, les feuilles sont le matériel végétal utilisé dans l'étude de la variabilité génétique par marqueurs moléculaires. Des échantillons des feuilles saines (couleur verte sans trace de maladie) ont été récoltés sur chaque individu à étudier. En général, les feuilles des arbres dans les forêts naturelles sont attaquées par des insectes ou présentent parfois des maladies (ex : fumagines). Par conséquent, les feuilles ont été prélevées sur le rameau qui a présenté des feuilles à majorité saines. Les feuilles (folioles) collectées pour chaque individu ont été supérieures à 30 pour

avoir les quantités suffisantes pour les différents essais à effectuer sur l'analyse moléculaire. Chaque échantillon des feuilles par individu a été conservé et séché dans des sachets contenant 10 g de silicagel durant son transport. Les caractéristiques des individus échantillonnés sont présentées en annexe I.

**Photo n°8:** Collecte des feuilles à partir d'une branche (cas d'arbre isolé à Bekorakaka)

### **VI.1.3- Analyse par marqueur moléculaire**

Les marqueurs moléculaires permettent d'observer de façon fine le polymorphisme de séquence de l'ADN au niveau de certain nombre de sites ou locus, repartis sur le génome. Ils ont de nombreuses applications possibles en génétique végétale. Il révèlent directement le polymorphisme de l'ADN, les séquences ciblées correspondantes ou non à des séquences codantes.

Dans cette étude, les 2 types de marqueurs utilisés pour la révélation des polymorphismes sont les marqueurs microsatellites chloroplastiques et nucléaires. La combinaison de ces deux marqueurs facilite la compréhension de l'historique et l'événement récent d'une population. Elle donne aussi des informations complémentaires sur le modèle entendu de flux de gène que les chloroplastes ont transmis par graines chez les angiospermes (Petit et *al*, 2005).

#### **a) Extraction d'ADN**

L'étude de la variabilité génétique est faite à partir de l'ADN des feuilles des individus étudiés. Leur extraction a été effectuée selon la méthode de Bosquet *et al* 1990. L'ADN est extrait à partir de 100 mg de feuilles sèches qui ont été broyées dans un mortier avec de l'azote liquide. 650 µl de tampon chaud ont été ajoutés dans la poudre mise dans un tube Eppendorf de 13 ml. Ce tampon est un mélange de 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]; 2% mixed alkyl trimethyl ammonium bromide [MATAB]; 1% polyéthylène glycol [PEG] 6000. Le mélange a été placé pendant 30 mn dans de bain-marie 65°C. Puis après, l'échantillon a été lavé avec du chloroforme (isoamyl alcohol, 24:1) pour enlever le débris cellulose et de protéine. Après 15 mn de centrifugation à 4500 tr/mn, la phase liquide a été transférée à nouveau dans un tube de 13 ml et l'échantillon est relavé encore avec du chloroforme puis centrifugé. La phase liquide est après transférée dans un autre tube de 13 ml. Des solutions d'acétate de sodium (3 M, pH 5,450µl) et d'isopropanol (5ml) ont été mélangées avec l'échantillon et les faire retourner doucement. Les mélanges ont été après placés à - 20°C pendant 15 mn pour la précipitation de l'ADN. La pelote d'ADN a été lavée avec l'éthanol 70% puis transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Ce dernier a été centrifugé pendant 5 mn à 1900 tr/mn. Après l'élimination de l'éthanol, la pelote d'ADN a été séchée et laissée en suspension avec 200 µl d'eau stérile pendant 20 mn à 37°C. L'extrait d'ADN a été stocké après à -20°C. Ce processus d'extraction est beaucoup détaillé en annexe II.

#### b) Mise au point et génotypage par les marqueurs microsatellites nucléaires

Compte tenu de leur taux de mutations élevées et de leur hérédité biparentale, les microsatellites nucléaires constituent des outils adaptés à une évaluation de la diversité et de la structuration génétique

##### **- Amplification et marquage**

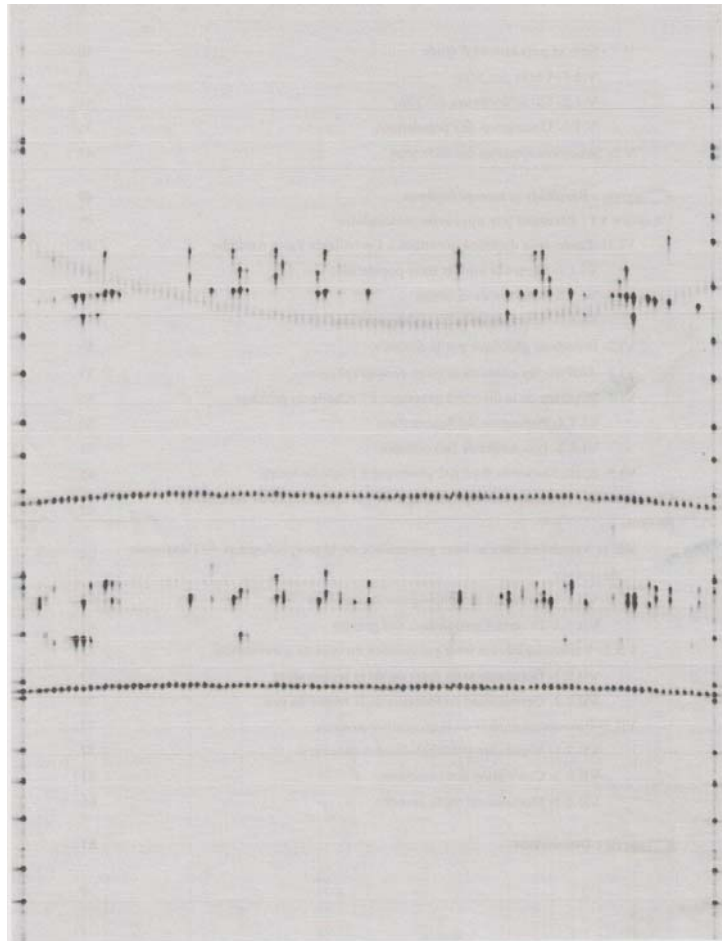
Huit microsatellites nucléaires polymorphes composés de répétitions de deux nucléotides ont été définis par la construction de la banque génomique du *Dalbergia monticola* (Favreau et al, 2007). Il s'agit de : mDmCIRA04, mDmCIRA08, mDmCIRA12, mDmCIRB06, mDmCIRC02, mDmCIRC10, mDmCIRD01 et mDmCIRD02. L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) se fait à l'aide de ces amorces. Les caractéristiques de ces 8 amorces sont décrites en annexe IX.

Chaque couple d'amorces a été marqué par une « queue M13 », sensible à la lumière, permettant de détecter avec l'appareil séquenceur (LICOR IR2) les produits d'amplification.

##### **- Génotypage avec le séquenceur LICOR**

Les produits d'amplification ont été analysés avec l'appareil séquenceur LICOR IR2. Ce dernier permet de lire les séquences ou polymorphisme des individus étudiés. Les différents protocoles et les conditions de manipulation du séquenceur sont donnés dans l'annexe IV. Les analyses des fichiers de gel sont faites avec le logiciel de génotypage Saga 2.0.

**Photos n°9** : Lors du dépôt des produits d'amplification dans le séquenceur LICOR-IR2  
(Laboratoire Cirad Lavalette)



**Photo n°10** : Photos de gel obtenu après lecture par le séquenceur LICOR IR2

**c) Mise au point et génotypage par les marqueurs microsatellites chloroplastiques**

Les microsatellites sont classés parmi les marqueurs multialléliques. Ils sont marqués par des répétitions en tandem de motifs nucléotidiques. Les motifs les plus courants sont (A)<sub>n</sub> ; (TC)<sub>n</sub> ;

(TAT)<sub>n</sub> ; (GATA)<sub>n</sub>, avec n le nombre de répétition varié. Les microsatellites sont utilisés comme marqueurs pour l'évaluation de la diversité génétique des populations car ils présentent des caractéristiques polymorphes très élevées.

Pour l'ADN chloroplastique, il est à noter qu'il est à hérédité uni parentale maternelle chez les angiospermes (Ndoyé, 2001). L'ADNc est donc transmis uniquement par la mère, et évolue assez peu au cours du temps car il n'y a pas de brassage génétique à ce niveau. Ces propriétés de l'ADNc et ces caractéristiques des marqueurs microsatellites permettent de suivre les flux de gènes chloroplastiques et d'analyser la dynamique de la diversité génétique à des échelles de temps importantes. Ils sont de bons marqueurs pour l'évaluation de la structure génétique des populations (Weising et Gardner, 1999).

a- Amplification par PCR

Après les tests effectués sur 8 individus avec les 40 paires d'amorces microsatellites décrits par Weising et Gardner, (1999) et Bryan et al, (1999), trois amorces ont montré de polymorphisme et ont été utilisées pour l'amplification des échantillons. Il s'agit des amorces : Ccmp4n Ccmp6, Ccmp7.

b- Migration sur gel d'acrylamide

La détermination du polymorphisme au niveau de chaque locus a été effectuée en faisant migrer les produits amplifiés sur gel d'acrylamide par électrophorèse.

c- Révélation au nitrate d'argent

La révélation du polymorphisme des séquences a été effectuée par la méthode photochimique de coloration en nitrate d'argent. Les bandes révélées sur le gel ont été photographiées. La différenciation ou non de la taille des bandes observés indique le polymorphisme des individus étudiés.

d) Méthodes d'Analyse de la diversité

Sur la diversité génétique, l'analyse des données avec les différents logiciels (Popgene, Fstat, Arlequin, Structure, Darwin, Phylip) permet d'avoir des résultats comparables et/ou complémentaires sur la structure de la diversité génétique à différentes échelles (aire naturelle, paysage), d'expliquer les flux de gène au sein et entre les populations étudiées et de tester l'isolement génétique par la distance des populations.

Dans cette analyse de la diversité génétique à l'échelle de l'aire naturelle de *Dalbergia monticola*, 517 individus ont été étudiés repartis dans 10 populations et de 20 sous populations.

## - Analyse de la diversité génétique à l'échelle naturelle

### Avec marqueurs microsatellites nucléaires

L'analyse des différents paramètres de diversité génétique a été effectuée avec les logiciels GENETIX et FSTAT. Des tests de significativité des valeurs observées des estimateurs de  $F_{it}$ ,  $F_{is}$  et  $F_{st}$  (Weir et Cockerham, 1984) ont été effectués. Cela est obtenu après trois séries de permutations : permutation globale sur les allèles, permutation des allèles à l'intérieur de chaque population et permutation globale des individus.

Une première analyse de la diversité du *Dalbergia monticola* au niveau de l'aire échantillonnée nous permet d'estimer le nombre d'allèles, l'hétérozygotie observée et l'hétérozygotie attendue selon les proportions d'Hardy-Weinberg, ainsi que l'indice de fixation  $F_{is}$  et l'indice de différenciation  $F_{st}$  (aussi appelé  $\theta$  de Weir et Cockerham). Ces paramètres sont calculés par le logiciel GENETIX version 4.05 (Belkhir et al., 1996). L'hétérozygotie attendue est calculée sans biais d'échantillonnage selon Nei (1978) selon la formule :

$$H_e = \sum_{k=1}^r h_k / r$$

avec  $h = 2n(1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$  et où  $h_k$  est la valeur de  $h$  au  $k$ ème locus,  $r$  est le nombre de locus,  $n$  est la taille de l'échantillon,  $x_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$  au locus  $k$  dans l'échantillon.

Pour considérer l'effet de variation des effectifs, le seuil de significativité des tests est ajusté selon la procédure séquentielle de Bonferroni de  $p\text{-value} = \alpha/n$ , avec  $n = 10$ , pour le nombre de populations, ou  $n = 20$  pour les sous-populations.

## - Etude de gradient de diversité

Des analyses ont été effectuées sur Excel pour observer les gradients de diversité sur les paramètres de diversité, par exemple l'hétérozygotie observée et attendue, l'indice de raréfaction en fonction de la latitude.

### Avec marqueurs microsatellites chloroplastiques

Dans l'analyse des données avec le marqueur microsatellites chloroplastiques, le chlorotype est défini comme la combinaison de différents allèles établis à chaque locus. Puisque qu'il n'y a pas de recombinaison naturelle de génome chloroplastique, les chlorotypes ont été traités comme allèles à un simple locus. La diversité de ces chlorotypes est donc analysée dans l'utilisation de ces marqueurs. L'étude de cette diversité et les paramètres de structure génétique ont été effectués avec le logiciel Arlequin version 2.0 (Schneider et al., 2000). Il s'agit de l'index de diversité de gène  $H_{cp}$ , le nombre

de chlorotypes (nacp) et le nombre effectif de chlorotypes (necp) selon Nei (1987). Ces différents paramètres ont été calculés pour chaque population et sous population.

#### **- Analyse de la structure de la diversité**

##### ***Structure génétique à l'échelle globale***

###### Avec marqueurs microsatellites nucléaires

Les indices de fixation de Wright ( $F_{is}$ ,  $F_{st}$  et  $F_{it}$ ) sont estimés selon Weir et Cockerhamm (1984), soit pour chaque paire de populations, soit sur l'ensemble des populations, soit pour chaque locus indépendamment ainsi que sur l'ensemble des loci (Raymond et Rousset, 1995).

Les  $F_{is}$  sont calculés pour chacune des populations et provenances ainsi que sur l'ensemble des échantillons prélevés.

Les  $F_{st}$  correspond à l'indice de différenciation qui mesure la diminution de l'hétérozygotie d'une sous population par rapport à la population totale, provoquée par la dérive génétique. Ces deux indices de diversité sont testés après 1000 permutations. Une matrice des  $F_{st}$  2 à 2 est générée, afin d'observer le niveau de la différenciation entre les provenances prédéfinies. La significativité des valeurs est définie après test des permutations (moins de 5% de valeurs supérieures à la valeur réelle) et la correction de Bonferroni ( $p \text{ value} = \alpha/n$ , avec n nombre populations testées)

Dans l'analyse, le nombre d'allèles est lié à l'effectif de la population. Or le nombre d'individus est très varié entre les différentes populations et sous populations. Par conséquent, l'estimation de l'indice R de richesse allélique avec Fstat.2.9.3.2 (Goudet, 2001) a été effectuée afin de pouvoir comparer le nombre d'allèles (et par conséquent la diversité) des différentes populations sans se préoccuper du biais lié à l'effectif de la population. Cet indice se base sur le plus petit nombre d'individus génotypés pour un locus et pour une population. Il s'agit de l'adaptation de l'indice de raréfaction de Hurlbert (1971), cité par Mousadik A & Petit, (1996) à la génétique des populations. Le principe est d'estimer le nombre d'allèles dans un sous échantillons de 2n gènes, étant donné que 2N gènes ont été échantillonnés ( $N > n$ )

Afin de comparer les indices de diversité entre les populations, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée grâce à XLSTAT (Addinsoft, XLSTAT Version 2007.6). Cela permet de savoir si la variable 'populations' et la variable 'locus' ont un effet sur notre jeu de données de génotypage. On cherche à définir l'équation du modèle :

$$Y_{ij} = \mu + \pi_i + R_{ij}$$

où  $\mu$  est la moyenne générale,  $Y_{ij}$  est la valeur du paramètre pour la population i au locus j,  $\pi_i$  est la valeur du paramètre pour le paramètre i et  $R_{ij}$  l'effet résiduel.



Les moyennes de différents paramètres de diversité sont comparées deux à deux grâce au test t par paires corrigé de Bonferroni, ce qui consiste à réduire le risque alpha par le nombre de sous populations en comparaison. Ici le risque alpha après correction est de 0.001 lors de l'étude de la variable 'populations'. Les ANOVA et les comparaisons se sont basées sur l'hétérozygotie observée, attendue (et non biaisée selon Nei, 1978) et l'indice de raréfaction R.

Afin de tester d'éventuels gradients de diversité, les pentes des modèles linéaires définis par ces trois paramètres en fonction de la latitude ont aussi été testés par test de Fischer avec XLSTAT

#### Avec marqueurs microsatellites chloroplastiques

Pour les marqueurs chloroplastiques, la structure génétique à l'échelle naturelle a été estimée à partir du logiciel AMOVA (Analysis of Molecular Variance) selon Escoffier et al (1992). Elle est essentiellement similaire aux autres approches d'analyse de variance de fréquences des gènes mais prend en compte le nombre de mutation de chlorotype. L'indice de différenciation  $F_{st}$  a été donc estimé lors de cette analyse.

#### ***Structure génétique à l'échelle paysage***

Les populations de Ranomafana et de Bekorakaka ont été étudiées pour cette étude au niveau plus local. Les analyses ont cherché à observer une structure génétique au sein de deux types de populations : la population exploitée de Bekorakaka et la population protégée du Ranomafana. Cette méthode d'étude à l'échelle paysage permet d'éviter un biais potentiel dans l'identification des populations a priori (Manel et al., 2003). Pour connaître l'organisation spatiale et temporelle de la diversité génétique de ces populations au niveau local, quelques modèles par approche bayésienne ont été appliqués. Cela permet aussi de comprendre le niveau de flux de gènes entre les populations.

#### ***- Comparaison de la structure de la diversité génétique***

Ici l'individu est beaucoup étudié. La population et les sous populations sont divisées en cohorte d'individus juvénile (diamètre inférieur à 10 cm) et d'individus adultes (diamètre supérieur à 10 cm). Les différents paramètres de diversité ont été comparés dans cette étude au niveau de population et entre les sous population pour chaque cohorte. Il s'agit du nombre d'allèle ( $N_a$ ), de la richesse allélique (R), l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ), les paramètres de F statistique de Wright ( $F_{is}$ ,  $F_{st}$  et  $F_{it}$ )

#### ***- Structure génétique de population à priori***

L'étude essaie d'analyser les données génétiques des populations sans les informations de localisations géographiques et de sous populations a priori, dans le but de détecter une structure génétique. Grâce au logiciel STRUCTURE, l'analyse a été effectuée suivant deux modèles :

- le modèle avec admixture : il recherche des populations ancestrales qui pourraient être à l'origine des populations présentes aujourd'hui, calcule la probabilité pour chaque nombre de populations ancestrales inférées. Le coefficient Q attribué à chaque individu correspond au coefficient de parties d'appartenance à telle ou telle population ancestrale trouvée.

- le modèle sans admixture : Ce modèle cherche à construire des clusters dont les fréquences alléliques suivraient une distribution de Dirichlet, ce qui revient à dire que les clusters sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Il calcule la probabilité associée à chaque nombre de clusters inférés. Le coefficient Q, attribué à chaque individu, indique la probabilité de l'individu d'appartenir à tel ou tel cluster inféré.

Pour les deux provenances, les deux modèles ont analysé les données à travers le logiciel Structure 2.2 (Pritchard et al, 2007) avec 80000 itérations de burn-in et 500000 itérations MCMC (Monte-Carlo Markov Chain) et ce sur 8 Juvéniles pour Bekorakaka avec 163 individus et 7 des 8 Juvéniles pour Ranomafana avec 173 individus.

#### *- Structure génétique en tenant compte les données géographiques*

Les distances géographiques entre les individus et les distances génétiques ont été étudiées en second lieu dans cette structure génétique, le spatial D-model dans le logiciel GENELAND (Guillot et al, 2005). Ce modèle prend en compte les distances géographiques des individus pour définir les populations, en posant l'hypothèse forte que toute structuration génétique est dépendante des conditions géographiques (distances physiques, mais aussi escarpement, discontinuités géographiques).

#### **- Détermination des effets de goulot démographique**

Pour détecter un possible événement de goulot d'étranglement au niveau de l'effectif, la méthode d'excès d'hétérozygotie décrite par Cornuet et Luikart (1996) a été appliquée. Le 'sign-test' et 'Wilcoxon's signed-rank test' nous ont permis de tester nos données. Il est posé comme hypothèse que tous les Juvéniles suivent un modèle 'two-phase mutation' : 95% de mutations pas à pas et 5% de mutations 'multi-step', comme il est conseillé par Piry et al. (1999) et proposé dans le logiciel Bottleneck. Les deux tests cherchent à montrer un excès d'hétérozygotie significatif qui est spécifique des populations ayant subi un événement de bottleneck récent.

Le sign-test nous donne la probabilité d'un excès d'hétérozygotie, et le 'Wilcoxon's signed-rank test' une p-value correspondant au rejet de l'hypothèse nulle (pas de goulot démographique récent). Ces tests ne sont pas applicables à des populations ou sous populations moins de 10 nombres d'individus.

#### **- Analyse des flux de gènes au sein et entre les populations**

##### *- Etude des migrants au niveau des populations et sous populations*

Afin de détecter des patrons de flux de gènes entre populations définies a priori, le programme Structure 2.2 a été utilisé en combinant les données de génotypage et les données de populations a priori.

Le modèle sans admixture identifie d'éventuels migrants de première, deuxième ou troisième génération avec une probabilité associée. On pose l'hypothèse d'allèles corrélés, et plusieurs runs indépendants sont effectués avec le nombre défini a priori, 200000 itérations MCMC et avec une période de burn-in de 80000 itérations, et ce pour différentes valeurs du paramètre  $v$  (0.05, 0.1, 0.2), qui correspond à la probabilité a priori d'un individu d'être un migrant dans une population donnée. (Pritchard et al, 2000)

#### **- Analyse des tests d'isolement par la distance**

Le concept d'isolement par la distance a été originellement introduit par Wright (1931). Il prédit, pour des individus ayant une position fixe dans une population continue, en ne considérant que des gènes neutres, une décroissance de l'identité génétique ( $Q$ ) avec l'augmentation de la distance géographique ( $r$ ). Ce phénomène s'explique par une dispersion limitée des gènes lors des événements de reproduction. A l'équilibre mutation-dérive-dispersion, sous un modèle de dispersion isotropique, la fonction  $Q(r)$  dépend de la fonction de dispersion des gènes, la densité efficace de la population ( $D$ ), du taux de mutation  $\mu$  et de la géométrie de la population.

En se plaçant dans le cadre de l'isolement par la distance, Wright (1943) définit le concept de taille de voisinage ( $N_b$ ). Dans le cas où la dispersion des gènes suit une loi normale centrée de variance  $\sigma^2 t$  en une ou deux dimensions (avec  $D$ =densité efficace de population), la dispersion des gènes doit créer des groupes d'individus fortement apparentés dont la taille  $N_b$  est donnée par :  $N_b = 4\pi D \sigma^2 t$  (en deux dimensions). La taille de voisinage dépend uniquement de  $\sigma^2 t$  la variance de dispersion des gènes, qui peut être subdivisée chez les plantes en variance de dispersion du pollen et des graines (Crawford, 1984). La structure génétique spatiale (SGS) doit être forte si  $N_b \approx 20$ , modérée si  $N_b \approx 200$ , nulle si  $N_b > 1000$  (quasi-panmixie).

### - Spatialisation de la diversité génétique au sein des populations

Au niveau du peuplement, on cherche à analyser la spatialisation de la diversité génétique grâce aux coefficients de kinship de Ritland (1996) entre les individus sur l'ensemble d'un peuplement, puis entre les individus adultes (avec des diamètres de plus de 10cm) et les individus que l'on peut considérer comme des juvéniles (diamètre inférieure à 10cm) et enfin entre combinaison adultes-juvéniles. Pour que ce coefficient de kinship soit représentatif, les peuplements analysés doivent être constitués d'individus répartis de façon continue, il ne doit pas y avoir de zone géographique sans individus trop grande. Le logiciel SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002) propose de calculer le coefficient de kinship grâce à l'équation suivante :

$$F_{ij} = \frac{\sum_l ((\sum_a \sum_{ci} \sum_{cj} (x_{lcia} x_{lcja} / p_{la}) / \sum_{ci} \sum_{cj} 1) - 1) / \sum_l (m_l - 1)}$$

où  $X_{lcia}$  est une variable indicative ( $X_{lcia}=1$  si l'allèle sur le chromosome  $c$  au locus  $l$  pour l'individu  $i$  est  $a$ , sinon  $X_{lcia}=0$ ),  $p_{la}$  est la fréquence de l'allèle  $a$  au locus  $l$  dans l'échantillon de référence,  $m_l$  est le nombre des allèles trouvés dans l'échantillon au locus  $l$ , et  $\sum_{ci}$  la somme sur les chromosomes homologues de l'individu  $i$ . Les valeurs de  $F_{ij}$  peuvent prendre des valeurs négatives pour des paires d'individus non apparentés. Ces valeurs sont testées par 10 000 permutations.

### - Représentation phénétique de la diversité génétique

Dans le but de dessiner des arbres phénétiques, la méthode de Neighbor-Joining a été utilisée à partir des distances génétiques entre les provenances et populations pour les deux types de marqueurs. Ces dernières ont été estimées entre paires de provenances et paires de populations définies a priori à l'aide de la distance de Cavalli-Sforza (1967), distance adaptée à la description de la structuration des populations en considérant leur histoire évolutive, et notamment les effets de dérive. La matrice de distance a été obtenue à partir du programme GENDIST de PHYLIP 3.66 (Felsenstein, 1993) et a permis à partir du programme Neighbor de construire un arbre de distances de Neighbor-Joining, suivant la méthode de Saitou et Nei (1987). La robustesse des nœuds a été évaluée à partir de 1000 bootstraps à l'aide du programme SEQBOOT et l'arbre consensus a été défini par le programme Consense. L'arbre consensus a été dessiné à l'aide du logiciel TreeView (Page, 1996).

Une autre méthode a été utilisée pour dessiner un arbre avec la méthode de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) avec des distances génétiques différentes : la matrice de  $F_{st}$  2 à 2 nous permet d'utiliser les  $F_{st}$  comme distance génétique, en utilisant le logiciel DARWIN 5.0.84 (Perrier et al., 2003).

## VI.2- Etude de la diversité de physiologie de germination

Pour la diversité de la physiologie de germination des graines, l'étude a été axée sur les caractéristiques morphologiques et anatomiques et la germination des graines. La démarche méthodologique consiste à tester et comparer le taux de différenciation entre et à l'intérieur des provenances afin de déterminer les corrélations au niveau de la diversité génétique et le taux de germination des graines.

### VI.2.1- Mode de récolte des graines

Les récoltes des graines ont été effectuées dans les populations de Bekorakaka et de Ranomafana. Ces derniers représentent le plus en terme de nombre d'individus. Dû à la rareté des pieds semenciers, tous les pieds produisant des graines ont été échantillonnés. Les fruits ont été récoltés et étiquetés par pieds pour chaque site pour pouvoir faire des essais inter et intra-provenance. Les caractéristiques de ces individus semenciers seront présentées dans l'annexe. Les fruits mûrs se dessèchent rapidement sur l'arbre et sous l'effet du vent et/ou des pluies ils tombent par terre. Les collectes sont donc effectuées sur l'arbre ou par terre. Mais les gousses collectées par terre sont en majorité pourries ou déjà germées sous l'effet des pluies. Il est nécessaire de signaler que la période de maturation des graines de l'espèce est située durant la période des pluies.

Lors de la fructification, les gousses sont infestées par des insectes et presque 80% des fruits sont avortés. La récolte de maximum de graines a été donc recommandée lors des descentes pour assurer les expérimentations. Le cycle de reproduction de l'espèce varie d'une année à une autre et varie aussi d'un pied à un autre.

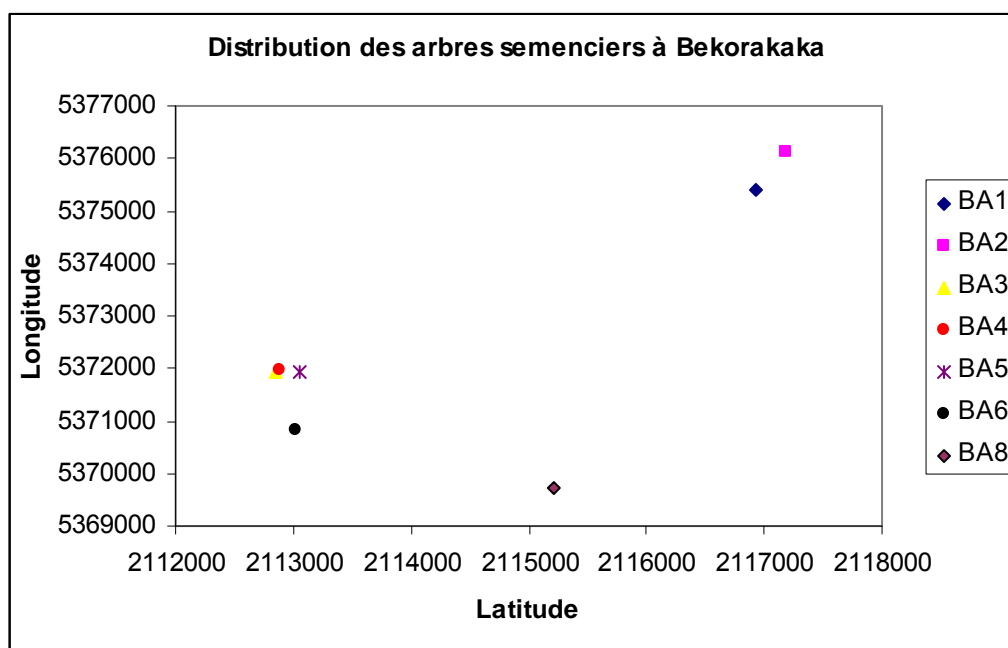
**Tableau n°3** : nombre d'individus échantillonnés

Provenance	Nombre d'individus
Ranomafana (Fianarantsoa)	11
Bekorakaka (Moramanga)	7

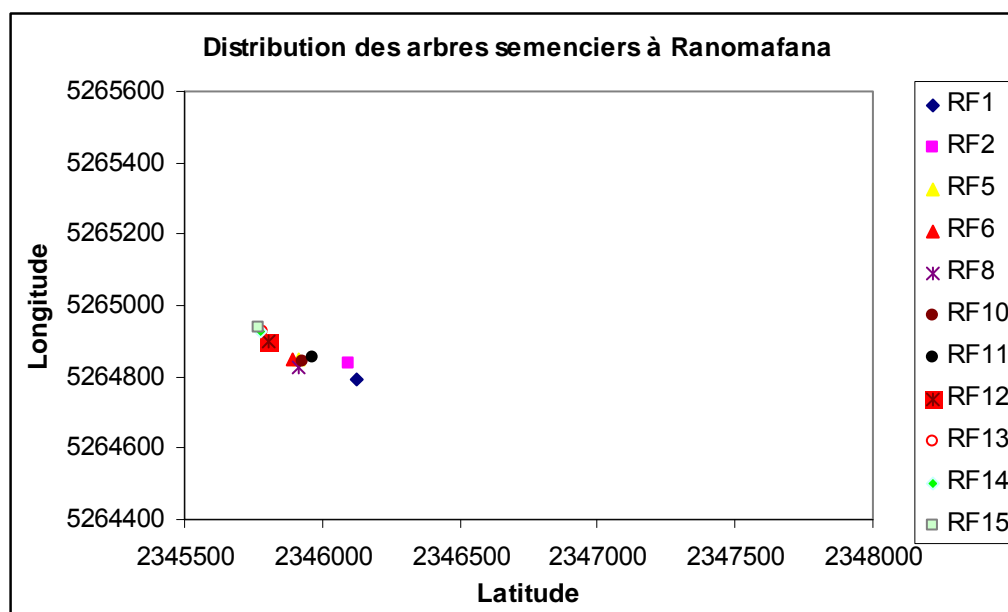
Les individus ayant de nombre suffisant des graines nécessaire pour les différents essais ont été utilisés lors des expérimentations. Pour la provenance de Bekorakaka, il s'agit de 6 individus BA1, BA3, BA4, BA5, BA6, BA8 et pour Ranomafana (6 individus) : RF5, RF10, RF11, RF12, RF13, RF15.

#### - *Distribution des arbres semenciers (arbres mères)*

Les graphiques ci après représentent la distribution des arbres semenciers dans les deux forêts de Bekorakaka et Ranomafana.



**Graphique n°3 :** Distribution globale des arbres semenciers pour la forêt de Bekorakaka



**Graphique n°4 :** Distribution globale des arbres semenciers pour la forêt de Ranomafana

Les arbres semenciers à Bekorakaka sont beaucoup isolés par rapport à ceux de Ranomafana.

### VI.2.2- Caractérisation des graines

Dans l'étude des caractéristiques des graines, trois types d'analyse ont été étudiés pour chaque site : analyse morphologique, analyse anatomique et analyse physiologique des graines.

### **- Analyse morphologique**

Pour mieux étudier la variabilité au niveau inter et intra provenance des graines, quelques caractéristiques morphologiques ont été étudiées. Il s'agit du poids, de la taille et la couleur des graines. Chaque lot de graines (par individu récolté) a été donc considéré.

Pour le poids, le pesage a été effectué avec 10 graines pour chaque lot. La densité est obtenue par extrapolation du poids obtenus sur les 10 graines.

Concernant la taille, la longueur et la largeur des graines ont été mesurées pour chaque lot. Les moyennes de chaque lot a été comparé après.

La couleur des graines est observée globalement à l'œil nu pour chaque lot.

### **- Analyse anatomique**

Dans cette partie, la qualité des graines a été observée par cutting test qui consiste à observe à l'œil nu l'état et la qualité intérieure des graines (cotyledon, embryon) en prenant au hasard 10 graines par individu et en faisant des coupes longitudinale. Le pourcentage des graines apparemment de bonne qualité est noté pour chaque lot afin de comparer la variabilité inter et intra provenance. Dans cette analyse anatomique, la teneur en eau des graines après la récolte a été observée pour connaître s'il en a des différences significatives entre les lots d'individus et entre les provenances.

### **- Analyse physiologique**

Cela concerne l'étude de la variabilité inter et intra provenance du taux de germination et le temps moyen de germination des graines. Les effets de la température et de la teneur en eau sur la germination des graines ont été analysés dans cette partie.

Concernant les tests sur l'effet de la température, 7 niveaux de température ont été utilisés pour connaître la température minimale, maximale et optimale de germination de *Dalbergia monticola*. Il s'agit de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C. Cela était choisi selon la disponibilité des incubateurs d'expérimentation et selon la variation climatique de l'origine écologique des graines.

Pour voir la variation de taux de germination en fonction de la teneur en eau, les valeurs de cette dernière obtenues lors de l'analyse anatomique des graines ont été utilisées lors des tests.

Le dispositif expérimental effectué lors du test au niveau du laboratoire du SNGF a été formé d'un bloc composé de 10 graines avec 4 répétitions. Le protocole d'essai de cette étude de physiologie de germination est présenté dans l'annexe VI.

Le temps moyen de germination est obtenu par la formule :

$$MTG = \frac{\sum D n}{\sum n}$$

Avec **n** nombre de graines germées à un temps D (nombre de jours depuis le début du test de germination)

Le test est arrêté au bout de 20 jours s'il n'y a plus de variation au niveau de la germination

**Photo n°11** : Essai de germination dans un incubateur à 20°C

### VI.2.3- Analyse statistique des données

Le logiciel Xlstat (version 2007.6) a été utilisé pour l'étude de variance des résultats obtenus au niveau de la morphologie, l'anatomie et la germination des graines. Un modèle faisant ressortir un effet provenance et un effet arbre dans les populations a été défini. Pour le test des provenances, le modèle a été défini comme suit :

$$Y_{ij} = \mu + P_i + R_{ij}$$

où  $\mu$  est la moyenne générale,  $Y_{ij}$  est la valeur du paramètre pour la provenance  $i$  au caractère  $j$ ,  $P_i$  est la valeur du paramètre pour le paramètre  $i$  et  $R_{ij}$  l'effet résiduel

Pour test des familles au sein de chaque provenance, le modèle se présente comme :

$$Y_{ij} = \mu + f_i + R_{ij}$$

où  $\mu$  est la moyenne générale,  $f_i$  effet individu mère  $i$  au caractère  $j$ ,  $R_{ij}$  effet résiduel



## **VI.3- Etude de la diversité de croissance juvénile**

### **VI.3.1- Mode d'essai**

Les plantules obtenues après les tests de germination des graines ont été repiquées pour étudier l'état de leur développement. L'objectif était de voir la variabilité au niveau du développement des plantules entre et à l'intérieur de provenance.

Le dispositif expérimental a été formé de d'un bloc de 10 plantules X 3 répétitions. Ce nombre de 10 plantules n'est pas gardé pour quelques blocs car il dépend du nombre des plantules obtenues après germination. Malgré cela, les 3 répétitions ont été respectées. Les calculs ont été après effectués à partir des valeurs moyennes par répétition et par bloc.

Deux caractères de croissance et deux caractères végétatifs de développement ont été étudiés (par mesure ou comptage) : hauteur totale, hauteur de l'hypocotyle, nombre des feuilles et nombre de folioles. Le protocole de mesure pour ces essais est présenté en annexe VI.

**Photo n°12** : Modèle de mesure de la hauteur totale du plant de *Dalbergia monticola*

**Photo n°13** : Vue d'ensemble de la croissance des plantules de *Dalbergia monticola* en pépinière

### VI.3.2- Analyses statistiques des résultats

La diversité de croissance juvénile des plants suit également la démarche méthodologique qui essaie de comparer l'inter et l'intra provenances de l'espèce au niveau de la croissance des plantules. Cela mène à l'étude des corrélations sur la diversité génétique et la croissance juvénile.

Pour chaque mesure effectuée pour les différents caractéristiques des graines et la croissance des plants, des calculs de valeur moyenne, de l'écart type (déviations standard) et de la variance ont été réalisés par le logiciel

- Moyenne (m) : moyenne arithmétique des valeurs obtenus

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

avec N : nombre de répétition

- Ecart-type ( $\sigma_x$ ) ou déviations standard : mesure la dispersion des valeurs obtenus autour de la moyenne

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

avec une probabilité située entre  $\bar{x} - \sigma_x$  et  $\bar{x} + \sigma_x$

- Variance : mesure le degré de dispersion de l'ensemble de données

$$V(X) = \sigma^2$$

Cette analyse de variance permet d'observer si les moyennes des échantillons sont significativement différentes ou non.

Le modèle défini pour l'analyse de l'effet provenance est :

$$Y_{ij} = \mu + P_i + R_{ij}$$

où  $\mu$  est la moyenne générale,  $Y_{ij}$  est la valeur du paramètre pour la provenance  $i$  au caractère  $j$ ,  $P_i$  est l'effet provenance (effet fixe) et  $R_{ij}$  l'effet résiduel

Au niveau intra provenance, le modèle se présente comme :

$$Y_{ij} = \mu + f_i + R_{ij}$$

où  $\mu$  est la moyenne générale,  $Y_{ij}$  est la valeur du paramètre pour la provenance  $i$  au caractère  $j$ ,  $f_i$  effet individu mère  $i$  (aléatoire) et  $R_{ij}$  effet résiduel

L'hypothèse nulle est donnée par  $\sigma^2 A = 0$ , c'est à dire les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différents.

### **- Estimation de l'héritabilité génotypique des caractères :**

L'application de l'analyse de la variance à la génétique forestière permet d'estimer les principaux paramètres génotypiques qui caractérisent les variables étudiées dans une population d'arbres. Les mesures prises sur le terrain donnent au niveau des moyennes des valeurs apparentes ou phénotypiques ( $P$ ), qui en réalité, se composent d'une « valeur génotypiques » ( $G$ ) et d'une valeur due à l'effet de l'environnement ( $E$ ), d'où

$$P = G + E$$

En terme de variabilité, la variance phénotypique  $\sigma_p^2$  se décompose comme suit :

$$\sigma^2 = \sigma^2(G+E) = \sigma^2_G + \sigma^2_E + 2 \text{Cov}(G,E)$$

où  $\sigma^2_G$  = variance génotypique

$\sigma^2_E$  = variance environnementale

$\text{Cov}(G,E)$  = covariance entre  $G$  et  $E$

Par définition, l'héritabilité génotypique est la part de la variance phénotypique attribuable à l'effet du génotype. Il traduit le degré d'hérédité de la variabilité génotypique parentale chez les descendants. Selon le modèle utilisé dans l'analyse de variance, le modèle de génétique quantitative associé se traduit par :

$$\sigma^2 f = 1/4 \sigma^2 A$$

où  $\sigma^2 f$  indique la variance génotypique au niveau individu et  $\sigma^2 A$  la variance génétique.

D'où l'estimation de l'héritabilité génotypique (héritabilité au sens large)

$$h^2 f = \sigma^2 f / (\sigma^2 f + \sigma^2 wf / R) = h^2_G$$

où  $\sigma^2 wf$  correspond à la variance résiduel et R est le nombre de répétitions.

Cette héritabilité au sens large exprime la part de la variabilité totale qui est reproductible à la génération suivante par voie végétative. Si la valeur de  $h^2 f$  est égale à 1, il y a eu transmission fidèle des caractères par les parents aux descendants.

Concernant l'héritabilité génétique ou l'héritabilité au sens stricte, sa valeur est estimé par la formule :

$$h^2_{ss} = 1/4 \sigma^2 A / (\sigma^2 f + \sigma^2 wf) = h^2_A$$

Les paramètres  $\sigma^2 f$  et  $\sigma^2 wf$  sont estimés à partir des «espérances mathématiques» des carrés moyens obtenus du tableau d'analyse de variance obtenu sur Xlstat.

La valeur de  $\sigma^2 f$  correspond à  $(CM_a - CM_r) / R$  et  $\sigma^2 wf = CM_a$

où  $CM_a$  : carrés moyens factoriels

$CM_r$  : Carrés moyens résiduels

R : nombre de répétition

F : variable de Fisher Snedecor =  $CM_a / CM_r$

Le degré de signification de l'héritabilité génotypique suit celui de la valeur de F, c'est-à-dire plus la valeur calculée de F est significative, plus l'héritabilité génotypique tend vers l'unité.

### **- Corrélation entre les caractères**

Des corrélations entre les 4 caractères étudiés ont été analysés à partir de la fonction « test de corrélation » sur le logiciel Xlstat. Ce test donne les coefficients de corrélation entre les différents caractères sous forme de matrice de corrélation selon le type de Pearson et ainsi la probabilité de signification ;

L'estimation des coefficients de corrélations est donné par la formule entre chacun de couple de variables (x, y)

$$R_p = \frac{\text{Cov p (x,y)}}{\sigma^2_p(X) \cdot \sigma^2_p(Y)}$$

Cov p : covariance phénotypique

$R_p$  : coefficient de corrélation phénotypique entre les valeurs phénotypiques des variables

X,Y : variable à étudier

## **3<sup>ème</sup> partie : Résultats et interprétations**

### **Chapitre VII : Diversité par approche moléculaire**

Ce chapitre représente les résultats obtenus des différentes analyses au niveau de l'étude de la diversité génétique. Il s'agit de la diversité proprement dite, de la structure de cette diversité à l'échelle globale et à l'échelle paysage (locale), de l'analyse des flux de gène, de l'isolement génétique et des effets de goulots démographiques.

#### **VII.1- Etude de la diversité génétique à l'échelle de l'aire naturelle**

##### **VII.1.1- Diversité intra et inter populations**

Les résultats obtenus sur les différents paramètres de diversité selon les deux types de marqueurs seront interprétés successivement dans cette partie.

###### *VII.1.1.1- Selon les marqueurs microsatellites nucléaires*

L'analyse des différents paramètres de diversité génétique a été effectuée avec les logiciels Genetix et Fstat. Il s'agit du nombre d'allèles moyen par locus ( $n_a$ ), de l'indice de richesse allélique ( $R$ ), de l'hétérozygotie observée et attendue ( $H_o$ ,  $H_e$ ) et l'indice de fixation ( $F_{is}$ ). Après élimination des individus présentant beaucoup de données manquantes, c'est-à-dire des individus montrant plus de 60% de données manquantes, le nombre total des individus étudiés était de 517. En effet, certaines populations ont été de faible effectif et les résultats obtenus sur ces dernières n'ont pas été considérés pour certains paramètres. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°4.

Les valeurs obtenues du paramètre de  $F_{is}$  qui mesure la réduction de l'hétérozygotie des individus à l'intérieur de leur sous population sont toutes positives, variant de 0,12 à 0,44. Mais 4 valeurs de ce paramètre sont non significatives (Tsaramolotra, Ampitsongona, Ambavala et Ankeniheny). L'hétérozygotie observée est inférieure à l'hétérozygotie attendue selon les fréquences alléliques et sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Ce dernier repose sur les principes de la panmixie, c'est-à-dire la participation de tout individu de la population ou sous population à la procréation. Cet équilibre est observé si les  $F_{is}$  sont nuls. Or les valeurs de  $F_{is}$  sont toutes positives et significatives pour toutes les populations, cela montre l'écart aux proportions de Hardy Weinberg. Cela veut dire que les populations peuvent être issues de croisements non panmixtiques. Il y a eu donc une faible dissémination des graines et de pollen et cela peut entraîner des croisements entre apparentés ou d'autofécondation.

**Tableau n°4** : Diversité génétiques par marqueurs microsatellites

Régions	Populations	Sous populations	N	na	R	Ho	He	Ecart type de He	Fis	%val<
Nord			16	6,87	6,20	0,49	0,75	0,32	0,37	100
	Tsaramolotra	Tsaramolotra	7	4,25		0,53	0,74	0,30	0,35	98,7
	Ampitsongona	Ampitsongona	9	4,25		0,45	0,61	0,37	0,27	99,7
Centre-Nord			57	12	6,53	0,53	0,82	0,25	0,36	100
	Didy		31	9	6,69	0,51	0,80	0,27	0,36	100
		Didy	13	5,63		0,55	0,69	0,28	0,22	100
		Valivona	18	7,38		0,49	0,82	0,29	0,41	100
	Ambohijanahary	Ambohijanahary	9	5,14		0,44	0,75	0,30	0,44	100
	Antsevabe		17	7,5	6,48	0,57	0,77	0,28	0,26	100
		Antsevabe	11	6,13		0,56	0,76	0,37	0,25	100
		Ambavala	6	4,25		0,6	0,67	0,35	0,12	87,5
Centre			224	16	6,62	0,55	0,79	0,21	0,30	100
	Ankeniheny		7	5,25		0,56	0,77	0,27	0,29	100
		Madiorano	4	4,13		0,57	0,75	0,34	0,27	99,7
		Ankeniheny	3	2,38		0,5	0,51	0,44	0,02	48,9
	Bekorakaka		188	14,63	7,29	0,55	0,79	0,21	0,31	100
		Ambodigoavy	8	5,75		0,62	0,81	0,37	0,25	100
		Sandrajahana	59	9,63		0,54	0,76	0,10	0,28	100
		Sahambaky	56	10,63		0,54	0,76	0,14	0,31	100
		Bekorakaka	55	11		0,55	0,75	0,15	0,26	100
		Manasamena	10	5,75		0,59	0,74	0,20	0,23	99,9
	Andasibe		29	8,63	6,73	0,56	0,77	0,27	0,28	100
		Analamazaotra	20	7,88		0,58	0,78	0,28	0,26	100
		Mantandia	9	5,13		0,52	0,67	0,30	0,24	99,9
Sud			220	18,13	6,99	0,63	0,80	0,19	0,22	100
	Tolongoina	Tolongoina	18	8,63	6,89	0,66	0,79	0,20	0,17	100
	Ranomafana		202	17,13	7,64	0,63	0,80	0,20	0,22	100
		Mahatazana	26	9		0,61	0,78	0,21	0,22	100
		R-Talatakely	117	13,75		0,59	0,78	0,14	0,23	100
		R-Vatolampy	59	11,88		0,64	0,75	0,17	0,15	100

N : nombre d'individus,

na : nombre d'allèles moyen par locus,

R : indice de richesse allélique : indice indépendant de l'effectif de la population

Ho : hétérozygotie observée,

He : hétérozygotie attendue calculée à partir des fréquences alléliques

Fis ((He-Ho)/He), %val&lt; : pourcentage de valeurs inférieures au Fis réel après 1000 permutations

Concernant les autres paramètres de diversité, les résultats obtenus sur l'indice de richesse allélique (R) n'ont pas présenté de différence significative au niveau des populations étudiées avec les valeurs variant de 6,48 à 7,64.

A propos de l'hétérozygotie attendu (Ho et He), les valeurs obtenues n'ont pas montré de différence significatives entre les régions et entre les populations (He varie de 0,75 à 0,82 entre les

régions et de 0,61 à 0,82 pour les populations) et les sous populations n'ont pas montrés et de et celles de He 0,61 à 0,81.

Par contre les valeurs observées sur le paramètre nombre d'allèle ( $n_a$ ) tant au niveau région que population ont présenté de différence significative avec  $n_a$  (région) variant de 6,87 à 18,13 et  $n_a$  (population) de 4,25 à 17,13. Mais, le faible valeur de  $n_a$  est observé dans les régions du Nord où le nombre des individus échantillonnés est trop petit. Or ce paramètre est généralement influencé par la taille d'effectif de population étudiée.

#### *VII.1.1.2- Selon les marqueurs microsatellites chloroplastiques*

Avec les trois amorces chloroplastiques polymorphes utilisés, 18 chlorotypes ont été obtenus. Les résultats d'analyse tableau ci après résume les valeurs des différents paramètres génétiques obtenus lors de l'analyse des données sur le logiciel Arlequin version 2000.

Sur les 18 chlorotypes obtenus, le C11 est beaucoup fréquent avec un taux de 20,13% et trois autres (C01, C02 et C06) a montré un fréquence près de 10%. Pour les autres chlorotypes, il varie entre 0,63 et 5,66%.

Concernant les paramètres de diversité, des différences ont été observées entre les régions. La région du Nord a présenté le plus faible valeur de diversité mais cela peut être traduit par son faible effectif d'individus échantillonnés. Pour les autres régions, la diversité est importante avec des valeurs de Hcp variant entre 0,62 et 0,82. La région du Centre a montré de forte diversité avec de nombre de chlorotypes égale à 12, de fréquence effectif de 5,78 et d'indice de diversité Hcp 0,82. Ces paramètres de diversité sont aussi importants au niveau des populations. Cela est bien observé par exemple au niveau des populations du Centre comme le cas de Bekorakaka et Andasibe (Nacp varie de 7 à 9, Necp 4,5 à 6,07, Hcp de 0,78 à 0,83). La figure n°2 montre la répartition des 18 chlorotypes dans les différentes populations étudiées

**Tableau n°5** : Paramètres de diversité génétique obtenus des marqueurs moléculaires chloroplastiques

Régions	Populations	Sous populations	N <sub>cp</sub>	N <sub>acp</sub>	N <sub>ecp</sub>	H <sub>cp</sub>
<b>Nord</b>			<b>13</b>	<b>2.0000</b>	<b>1.1655</b>	<b>0.1420</b>
	Tsaramolotra	Tsaramolotra	7	2.0000	1.3243	0.2449
	Ampitsongona	Ampitsongona	6	1.0000	1.0000	0.0000
<b>Centre-Nord</b>			<b>49</b>	<b>7.0000</b>	<b>3.6545</b>	<b>0.7264</b>
	<i>Didy</i>		26	5.0000	2.7040	0.6302
		Didy	15	5.0000	2.1028	0.5244
		Valivona	11	1.0000	1.0000	0.0000
	<i>Anbohijannahary</i>	<i>Anbohijannahary</i>	10	6.0000	5.0000	0.8000
	<i>Antsevabe</i>		13	3.0000	2.4493	0.5917
		Antsevabe	11	2.0000	1.8615	0.4628
		Ambavala	2	1.0000	1.0000	0.0000
<b>Centre</b>			<b>39</b>	<b>12.0000</b>	<b>5.7833</b>	<b>0.8271</b>
	Ankeniheny	Madorano /Ankeniheny	8	4.0000	2.2857	0.5625
	<i>Bekorakaka</i>		10	7.0000	4.5455	0.7800
		Ambodigoavy Sandrajahana <sup>(2)</sup> Sahambaky <sup>(2)</sup> Bekorakaka <sup>(2)</sup> Manasamena	9	6.0000	3.8571	0.7407
	<i>Andasibe</i>		1	1.0000	1.0000	0.0000
			21	9.0000	6.0411	0.8345
		Analamazaotra	14	6.0000	3.7692	0.7347
		Mantadia	7	5.0000	4.4545	0.7755
<b>Sud</b>			<b>58</b>	<b>5.0000</b>	<b>2.6488</b>	<b>0.6225</b>
	<i>Tolongoina</i>	<i>Tolongoina</i>	15	3.0000	2.2727	0.5600
	<i>Ranomafana</i>		43	4.0000	2.4621	0.5938
		Mahatazana	26	3.0000	1.2659	0.2101
		Talatakely	17	2.0000	1.7101	0.4152
		Vatolampy				
<b>Total</b>			<b>159</b>	<b>18.0000</b>	<b>9.8792</b>	<b>0.8988</b>

N<sub>cp</sub> : nombre d'individus;N<sub>acp</sub> : nombre de chlorotypes par sous population,N<sub>ecp</sub> : nombre de chlorotype effectif,H<sub>cp</sub> : indice de diversité chlorotypique

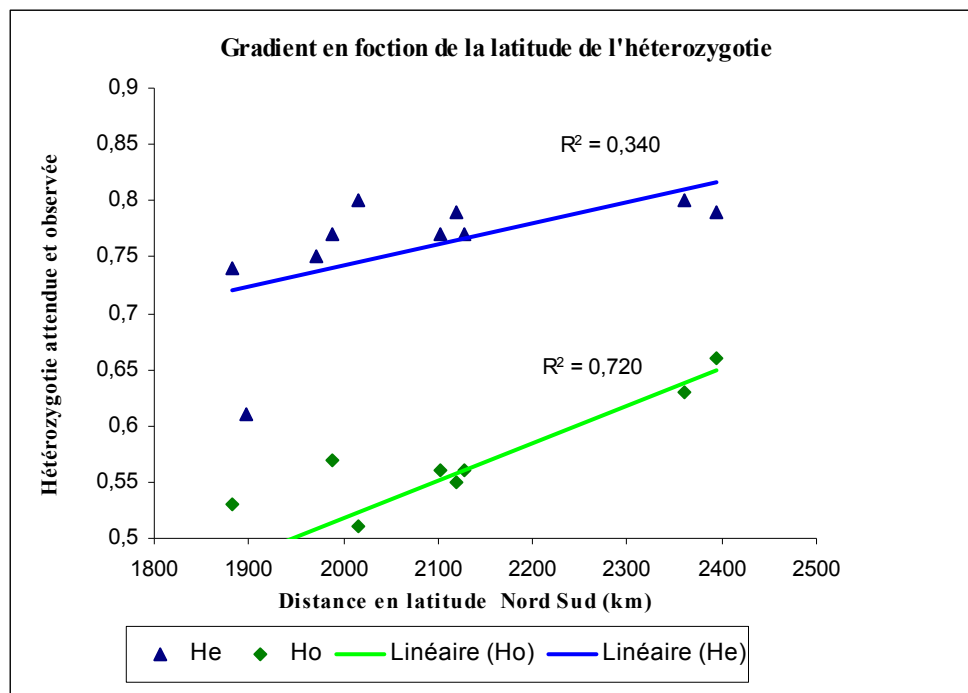
(2) : Sous populations non étudiées pour chloroplaste



**Figure n°2** : Répartition des chlorotypes dans les différentes populations échantillonnées

### VII.1.2- Gradient de diversité

Avec les résultats obtenus par marqueurs microsatellites nucléaires, l'analyse des gradients des paramètres de diversité en fonction de la distance en latitude a été effectuée. Parmi les paramètres étudiés, c'est l'hétérozygotie observée qui a donné un coefficient de régression important ( $R^2 = 0,72$ ). Le graphique ci-dessous représente la droite de régression obtenue.



**Graphique n°5** : Gradient de l'indice de raréfaction en fonction de la distance en latitude

Pour l'hétérozygotie observée (Ho), le coefficient obtenu est de 0,720 tandis que pour les autres paramètres il varie de 0,340 à 0,510. Ce coefficient obtenu pour Ho permet de dire que la diversité augmente en descendant du Nord vers le Sud. Au niveau de l'indice de richesse allélique R, le gradient de diversité en fonction de la latitude n'a pas très remarqué avec le coefficient de régression de 0,51.

### VII.1.3- Structure de la diversité génétique

Les résultats d'analyse sur l'indice de différenciation obtenus sur les deux types de marqueurs sont interprétés dans cette sous partie pour expliquer la structure de la diversité des populations.

#### VII.1.3.1- Structure par marqueurs microsatellites nucléaires

Pour le paramètre  $F_{st}$  qui correspond à l'indice de différenciation et qui mesure la diminution de l'hétérozygotie d'une sous population par rapport à la population totale, la valeur globale obtenue est de 0,07. Cette valeur est relativement faible. Cela signifie que la différenciation des populations de *Dalbergia monticola* dans l'ensemble de son aire naturelle est peu structurée.

Le tableau suivant représente la matrice de  $F_{st}$  par paire de provenances après analyse sur logiciel GENETIX 4.05

**Tableau n°6 :** Matrice de  $F_{st}$  par paire de populations (*Test avec 1000 permutations*)

	Nord		Centre-Nord			Centre			Sud	
FST	TSRM	AMPTS	Didy	AMBHJ	ANTSV	ANKN	BEKR	ANDB	TLGN	RNFN
Tsaramolotra	0	0.024	0.072	0.103	<b>0.104</b>	0.105	<b>0.085</b>	0.063	<b>0.087</b>	<b>0.092</b>
Ampitsongona		0	<b>0.102</b>	0.082	0.078	<b>0.102</b>	<b>0.103</b>	<b>0.076</b>	<b>0.151</b>	<b>0.129</b>
Didy			0	<b>0.075</b>	<b>0.077</b>	0.032	<b>0.066</b>	0.024	<b>0.084</b>	<b>0.092</b>
Ambohojanahar				0	0.026	0.078	<b>0.070</b>	<b>0.093</b>	<b>0.096</b>	<b>0.079</b>
Antsevabe					0	0.082	<b>0.065</b>	<b>0.089</b>	<b>0.087</b>	<b>0.082</b>
Ankeniheny						0	0.043	0.017	<b>0.101</b>	<b>0.081</b>
Bekorakaka							0	<b>0.030</b>	<b>0.071</b>	<b>0.075</b>
Andasibe								0	<b>0.092</b>	<b>0.090</b>
Tolongoina									0	<b>0.022</b>
Ranomafana										0

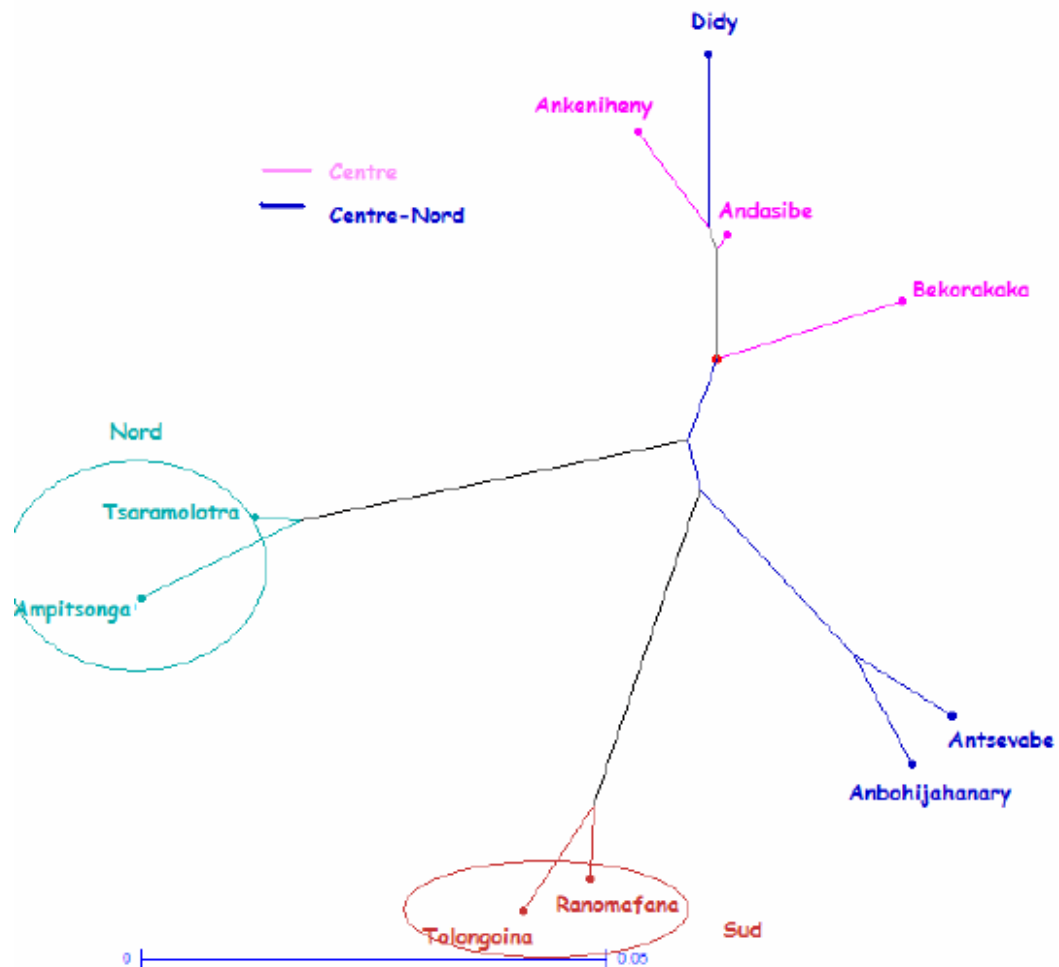
TSRM : Tsaramolotra, AMPTS : Ampitssongoina, AMBHJ : Ambohijanahary , ANTSV : Antsevabe, ANKN : Ankeniheny, BEKR : Bekorakaka, ANDB : ,Andasibe, TLGN : Tolongoina, RNFN : Ranomafana  
(en gras les valeurs significatives après permutations et correction de Bonferroni)

D'après les tests de signification, les valeurs observées au niveau du  $F_{st}$  des populations du Sud avec les autres populations sont toutes significatives. Elles sont aussi significatives entre les sous populations du Sud. Pour les autres populations, les faibles effectifs des individus de population et des sous populations peuvent expliquer la non signification du  $F_{st}$  : cas du Nord et du Centre Nord.

Pour la population du Sud, la diminution de l'hétérozygotie des sous populations peut être expliquée par le faite que leur distance géographique est plus importante par rapport aux autres populations. Cela peuvent conduire à leur isolement et entraîne un flux de gène moins efficace.

- Structure de l'arbre de Neighbor-Joining par les marqueurs microsatellites nucléaires

La construction de l'arbre de Neighbor-Joining ci après est faite à partir des valeurs de  $F_{st}$  entre paires de populations. Ces valeurs sont utilisées comme distances génétiques.



**Figure n°3 :** Structure de l'arbre de Neighbor-Joining à partir des données nucléaires (*après test de 1000 permutations*)

L'arbre montre que les populations du Nord et du Sud sont éloignées du point de vue distance génétique. Mais en général, les populations se regroupent selon leur région sauf pour la population de Didy qui se rapproche de la population du Centre. La grande séparation entre le Nord et le Sud peut être expliquée par la distance géographique qui les sépare et qui entraîne un faible flux de gène entre les populations de ces régions.

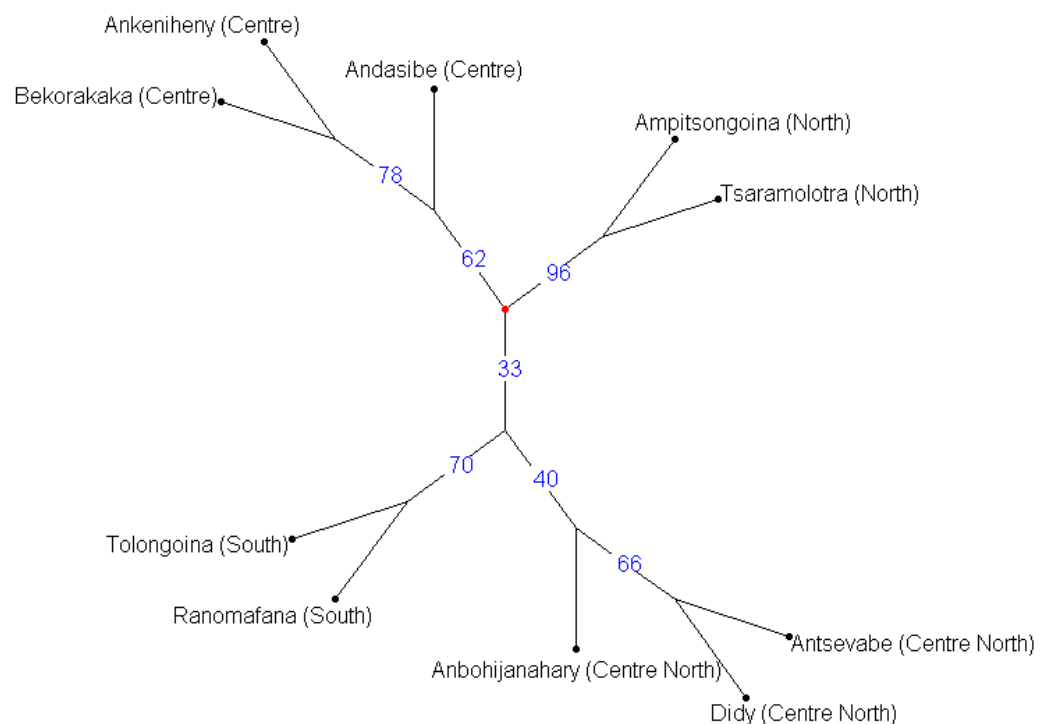
#### VI.1.3.2- Structure par marqueurs microsatellites chloroplastiques

Avec les marqueurs microsatellites chloroplastiques, la différenciation est beaucoup observée tant au niveau population que sous population. Les valeurs de  $F_{st}$  au niveau des populations sont élevées et significatives ( $F_{st} = 0,49$ ). Les résultats d'analyse sur AMOVA ont montré que 43% de la variabilité a été distribué au niveau des régions et 6% au niveau des populations à l'intérieur de région. A l'échelle de sous population, l'analyse a donné une importante valeur de  $F_{st}$  égale à 0,65 dont 38% de variabilité a été répartie au niveau de régions et 26% à travers des sous populations.

L'analyse par paire de  $F_{st}$  des populations a présenté des valeurs variées entre 0,049 à 0,76. Treize valeurs par paire de  $F_{st}$  a été significativement différent de 0.

#### - Structure de l'arbre de Neighbor-Joining par les marqueurs microsatellites chloroplastiques

La figure ci après représente la structure de l'arbre de Neighbor-Joining avec le logiciel DARWIN



**Figure n°4** : Structure de l'arbre de Neighbor-Joining à partir des données chloroplastiques (après test de 1000 permutations)

## VII.2- Isolement génétique par la distance

Les résultats d'étude sur l'indice de différenciation  $F_{st}$  ont déjà montré une diminution de taux de l'hétérozygotie des populations du Nord au Sud. Cette diminution est expliquée par la distance géographique des régions des populations étudiées. Dans cette partie, la corrélation entre ces valeurs de  $F_{st}$  et les distances géographiques des populations sont étudiées. Cela est faite à partir de la matrice de  $F_{st}$  2 à 2 entre les populations, et la matrice des distances géographiques 2 à 2 entre les populations en analysant la variation des  $F_{st}$  de paires de populations en fonction de la distance géographique (Rousset, 1996)

Avec le test de Mantel, on a révélé une corrélation positive et significative entre les distances génétiques et géographiques avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0.63 et une probabilité associée de 0.012. L'indice de différenciation  $F_{st}$  augmente avec la distance.

### VII.3- Analyse des effets de goulots démographiques

L'étude essaie de connaître si, la réduction des effectifs au niveau des juvéniles polymorphes due à l'exploitation intensive montre une rapide réduction de la diversité allélique que de l'hétérozygotie. C'est-à-dire, voir si la population étudiée présente un excès d'hétérozygotie qui marque les populations ayant subi les effets de goulots démographiques. Les résultats des tests sont présentés dans le tableau n°7 ci-après.

**Tableau n° 7 :** Résultats obtenus sur Wilcoxon's sign-rank test

Populations	Sign test (probabilité)	Wilcoxon's test (p-value)
Tsaramolotra	0,56	0,32
Ampitsongona	0,45	0,56
Didy	<b>0,07</b>	<b>0,96</b>
Ambohijanahary	0,59	0,53
Antsevabe	0,21	0,83
Ankeniheny	0,17	0,90
Bekorakaka	<b>0,08</b>	<b>0,81</b>
Andasibe	<b>0,18</b>	<b>0,81</b>
Ranomafana	<b>0,03</b>	<b>0,98</b>
Tolongoina	<b>0,02</b>	<b>0,98</b>

(en gras les populations ayant des effectifs supérieur à 10)

Le sign-test donne la probabilité d'un excès d'hétérozygotie, et le 'Wilcoxon's test' la p-value correspondant au rejet de hypothèse nulle qui indique l'absence d'effet du goulot démographique.

D'après le tableau, les probabilités d'excès d'hétérozygotie obtenues ne montre pas pour les populations ayant de nombre d'individus supérieur à 10 qu'elles sont en situation de bottleneck récent. Cela est confirmé avec les valeurs de p-value de Wilcoxon obtenues (risque alpha de 0,05).

#### VII.4- Structure de la diversité génétique à l'échelle du paysage

Cette étude à l'échelle locale permet de comparer la structure génétique et le flux de gène au niveau des deux types de populations : la population exploitée de Bekorakaka et celle apparemment non exploitée de Ranomafana (forêt protégée depuis vingtaine d'année).

##### VII.4.1- Population de Ranomafana

La structure locale de la diversité génétique, la structure génétique défini à priori et le nombre des migrants par population seront analysés dans cette sous partie.

###### - *Structure locale de la diversité génétique*

Des différences significatives sont observées au niveau du nombre d'allèles ( $N_a$ ) pour les deux sous populations de Ranomafana (Vatolampy et Talatakely) et pour l'ensemble de la population. La taille (effectif d'individu important) de population et des sous populations peut expliquer cette différence. Le nombre d'individus adultes est trois fois plus grand que ceux de juvénile. La différence est faiblement significative pour les paramètres richesses alléliques et hétérozygotie attendue.

Concernant l'index de fixation, les valeurs de  $F_{IS}$  observées entre les groupes d'individus adulte et juvénile pour la population de Ranomafana et pour la sous population de Talatakely sont significativement différentes (voir tableau n° 7).

Au niveau des valeurs de  $F_{ST}$  entre les groupes ou cohortes, il n'y a pas de différence remarquable pour la population ( $F_{ST} = -0.002$ , avec  $P=0.18$ ) et pour les deux sous populations ( $F_{ST} = -0.006$ , avec  $P=0.47$  et  $F_{ST} = -0.008$ ,  $P=0.66$ ).

**Tableau n°8 :** Estimation des paramètres génétiques de cohortes pour la population et sous populations de Ranomafana

Populat ion	Sous population	cohortes	Valeur par cohorte					Structure de l'ensemble de cohorte dans la population et chaque sous populations			Structure de cohortes à l'intérieur de populations		
			N	na	R	He	F <sub>IS</sub> /cohorte	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>
Ranomafana		Adulte	106	16.00	10.2	0.76	0.076**				0.082	0.013	0.070
		Juvenile	35	11.40	9.85	0.74	-0.015				-0.011	0.008	-0.019
		Adulte+											
		juvenile		-	-	-	-	0.057	-0.002	0.059			
	Talatakely	adulte	64	13.8	8.55	0.76	0.098*						
		Juvenile	28	10.6	8.57	0.75	-0.032						
		Adulte+											
		juvenile		-	-	-	-	0.062	-0.006	0.068			
	Vatolampy	Adulte	42	12.80	4.52	0.74	0.035						
		Juvenile	7	4.80	4.03	0.66	0.023						
		Adulte+											
		juvenile		-	-	-	-	0.027	-0.008	0.035			

\* : significatif à 0,001 d'après correction de Bonferroni

N : nombre d'individus,

na : nombre d'allèles moyen par locus,

R : indice de richesse allélique : indice indépendant de l'effectif de la population

Ho : hétérozygotie observée,

He : hétérozygotie attendue calculée à partir des fréquences alléliques

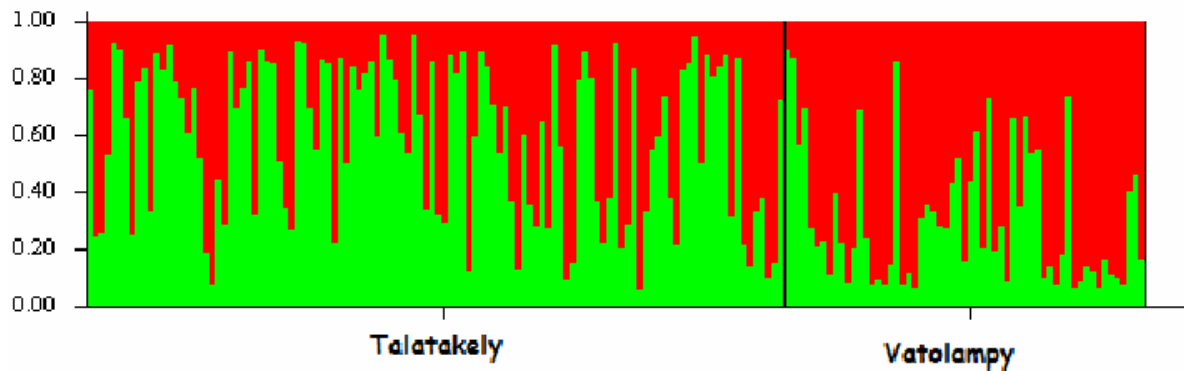
(F<sub>IS</sub>, F<sub>ST</sub>, F<sub>IT</sub>) : indice de fixation de Wright

- *Structure génétique à priori (sans tenir compte des informations spatiales)*

L'analyse sur le logiciel STRUCTURE suivant le modèle avec admixture a trouvé deux types de migrants pour Ranomafana. Ce modèle donne pour chaque individu un coefficient d'appartenance à chacune des populations ancestrales (appelé aussi coefficient de membership). Cela se traduit comme une portion de génome qui vient de la population ancestrale défini par deux couleurs (vert et rouge) pour chaque individu. La figure n°3 représente ces coefficients de « membership » pour chacun des individus sous la forme d'histogrammes cumulés.

D'après les résultats, aucun individu n'a un génome ne provenant que d'une des deux populations. Ils sont presque tous hybrides. Les deux sous populations a priori ne viennent pas de chacune d'une des deux populations ancestrales définies par le modèle. Mais d'après le coefficient de membership, chaque sous population de Ranomafana présente des tendances d'appartenance : les individus de Talatakely se retrouve dans la population verte et inversement ceux de Vatolampy dans la population rouge.

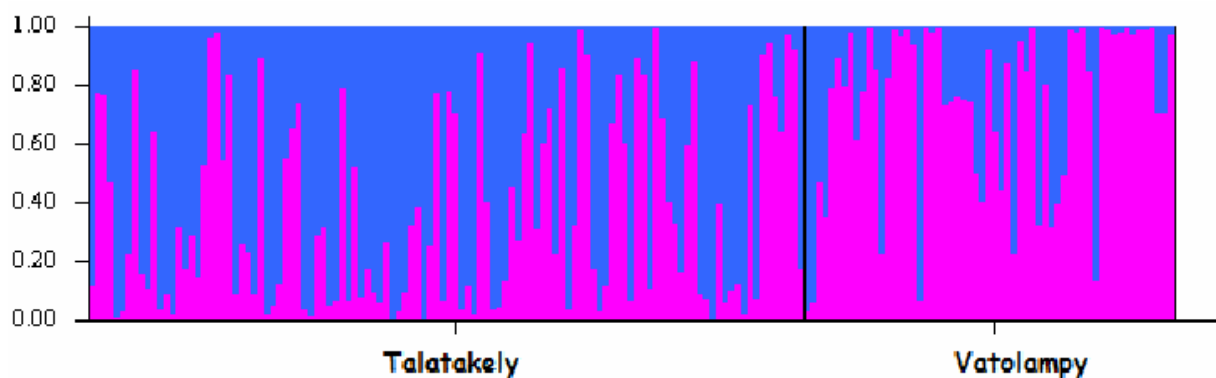




**Figure n5** : Histogramme des coefficients de membership pour la population de Ranomafana

La longueur de l'histogramme pour chaque sous population correspond à la taille d'effectif d'individus étudiés.

- Suivant le modèle sans admixture, l'analyse des données de génotypage a donné deux types de clusters. Ces clusters sont définis à priori par le modèle selon le principe des proportions de Hardy-Weinberg sur les fréquences alléliques. La figure n°4 illustre la tendance des probabilités pour chacun des individus d'appartenir à l'une des deux clusters bleu et rose définis a posteriori. Comme avec les modèles avec admixture, il y a une tendance de fortes probabilités pour les individus de Talatakely d'appartenir à la population bleue, et de fortes probabilités de ceux de Vatolampy à la population rose. Mais, comme pour le modèle avec admixture, certains individus ne suivent pas cette tendance : des individus de Talatakely avec une forte probabilité d'appartenir à la population rose et des individus de Vatolampy avec une forte probabilité d'appartenir à la population bleue.

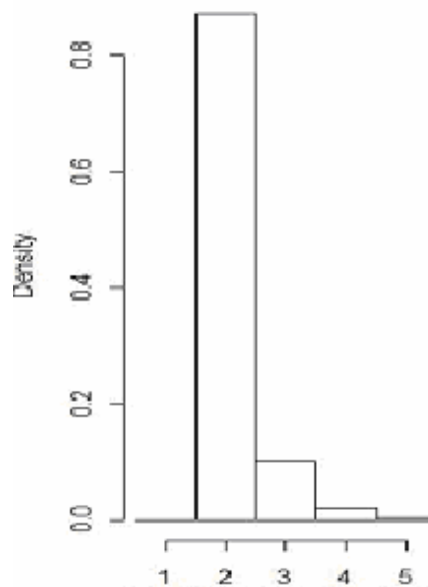


**Figure n°6** : Histogramme des probabilités d'appartenance des individus pour la population de Ranomafana

D'après la figure, il y a eu d'échange entre les populations ancestrales et cela s'est reflété dans la population actuelle.

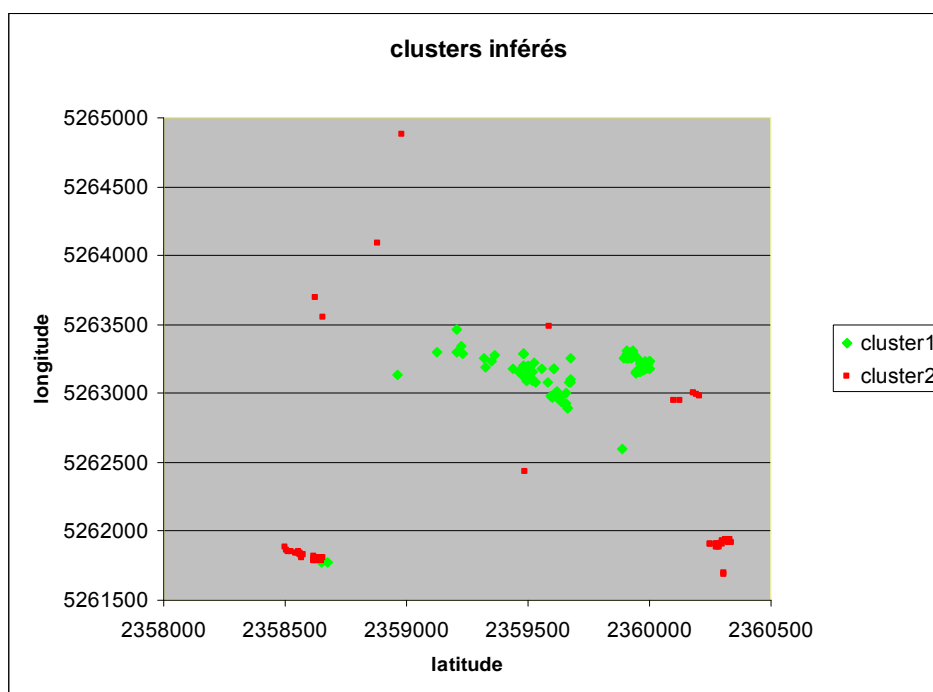
- *Structure génétique tenant compte des données spatiales*

Avec le modèle D-Spatial du logiciel GENELAND, l'analyse a été effectuée en prenant compte des distances géographiques des individus pour définir les populations. L'hypothèse est que toute structuration génétique est dépendante des conditions géographiques. Les résultats obtenus trouvent deux clusters dans l'ensemble des individus de Ranomafana. Le modèle donne alors pour chaque individu, les probabilités a posteriori d'appartenir à chacun des clusters (Figure n° 7).



**Figure n°7:** Histogramme des probabilités associées au nombre de clusters inférés  
(Modèle D-spatial 200 000 itérations, K=1 à 5, 173 individus, 7 loci)

Le graphique ci après nous montre la distribution des clusters inférés en affectant chaque individu à une des deux populations en fonction des probabilités a posteriori. Une différence a été observée par rapport au modèle sans considération des données spatiales. Les individus de Vatolampy se regroupent dans le cluster rouge et se trouvant dans les longitudes les plus basses, exceptés les deux individus qui se retrouvent au cluster vert avec des probabilités très forte de 0.9. Le cluster 1 (vert) semble être assez bien délimité entouré du cluster 2 (rouge).



**Graphique n°6 :** Distribution spatiale des clusters inférés par le modèle D-spatial de GENELAND

- *Etude des migrants au niveau de population*

Avec le logiciel Structure, en utilisant l'information des sous populations a priori, plusieurs tests indépendants ont été réalisés avec le nombre fixe de populations ( $K=2$ ) et différentes valeurs des paramètres  $v$  ( $v= 0,05$  à  $0,10$  ou  $0,20$ ), qui correspond à la probabilité a priori d'un individu d'être migrant dans une population donnée. Le nombre de migrants issus du test est égal à 2 pour la population de Ranomafana. Le tableau ci-dessous représente les résultats à différentes valeurs de ' $v$ '.

**Tableau n°9 :** Nombre des migrants entre les sous populations à Ranomafana

Population	Sous populations	$v=0.05$	$v=0.10$	$v=0.20$
Ranomafana	Talatakely	1	2	2
	/Vatolampy			

#### VII.4.2- Population de Bekorakaka

Comme la population de Ranomafana, la structure locale, la structure génétique défini à priori et le nombre des migrants par population seront analysés.

##### - Structure de la diversité génétique locale

Pour chaque sous population de la population exploitée de Bekorakaka, l'analyse des paramètres de diversité génétique a montré qu'il n'y a pas de différence significative au niveau de cohorte d'individus juvénile et adulte de chaque sous population, à savoir le nombre d'allèle ( $N_a$ ), la richesse allélique ( $R$ ), l'hétérozygotie attendue ( $e$ ) et l'indice de fixation ( $F_{is}$ ). Par rapport à la population de l'aire protégée de Ranomafana, ce dernier a eu de différence significative au niveau du nombre d'allèles moyens tant au niveau population que sous populations.

La différenciation est faible pour l'ensemble de cohorte au niveau de population :  $F_{st}= 0,034$  et  $0,043$  pour adulte et juvénile cohortes. Il n'y a pas aussi de différence significative entre juvénile et adulte cohorte pour la totalité des individus de Bekorakaka et les trois sous populations : Bekorakaka, Sahambaky et Sandranjahana ( $F_{ST}= -0.007$ , avec  $P=0.47$ ,  $F_{ST}= -0.003$  avec  $P= 0.34$  et  $F_{ST}= -0.012$  avec  $P= 0.46$ ).

**Tableau n°10** : Estimation des paramètres génétiques de cohortes de la population et sous populations de Bekorakaka

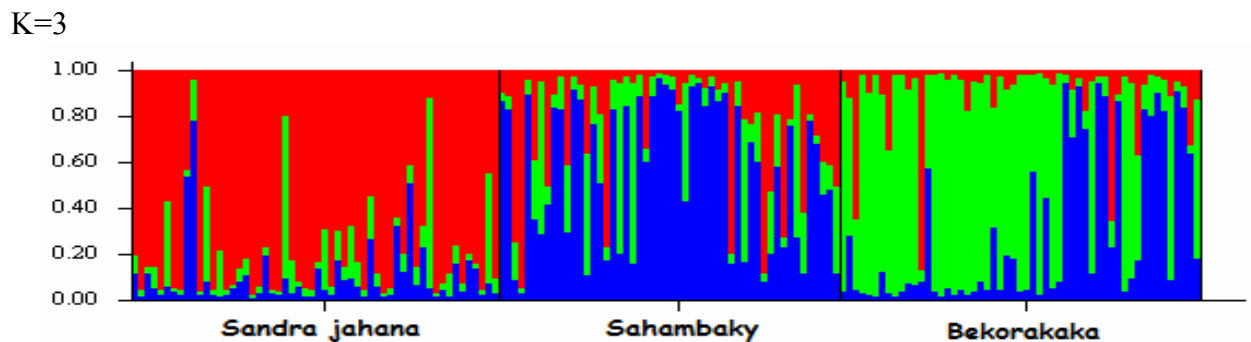
Populat ion	Sous population	cohortes	Valeur par cohorte					Structure de l'ensemble de cohorte dans la population et chaque sous populations			Structure de cohortes à l'intérieur de populations		
			N	na	R	He	$F_{is}$ /cohorte	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
Bekorakaka		Adulte	85	12.5	12.06 12.5	0.79	0.293***				0.301	0.034	
		Juvenile	78	12.83	5	0.80	0.265***				0.275	0.043	-0.019
		Adulte+ juvenile	163	-	-	-	-	0.278	-0.002	0.280			
Bekorakaka		adulte	24	9.00	8.37	0.77	0.296***						
		Juvenile	31	9.50	8.03	0.77	0.259***						
		Adulte+ juvenile	55	-	-	-	-	0.271	-0.007	0.276			
Sahambaky		Adulte	29	8.53	9.50	0.76	0.261***						
		Juvenile	23	8.02	8.33	0.79	0.230***						
		Adulte+ juvenile	52	-	-	-	-	0.245	-0.003	0.247			
Sandrajahana		Adulte	32	9.17	8.68	0.79	0.272***						
		Juvenile	24	9.67	9.49	0.77	0.237***						
		Adulte+ juvenile	56	-	-	-	-	0.248	-0.012	0.257			

\* : significatif à 0,001 d'après correction de Bonferonni

##### - Structure génétique à priori (sans tenir compte des informations spatiales)

Les coefficients de membership sous forme d'histogrammes cumulés pour chacun des individus des trois populations a priori sont représentés dans la figure n° 6 ci après. K correspond au nombre de populations ancestrales définies par le modèle. D'après l'histogramme, pour K=3, la population (défini à priori) de Sandrajahana semble être moins mélangée par rapport aux deux autres (Sahambaky et Bekorakaka). Cela peut être expliqué par le fait que la sous population de Sandrajahana est plus éloignée des deux autres qui sont rapprochées l'une de l'autre.

A partir de ce coefficient de membership, les individus de Sandranjahana peuvent être définis appartenir à la population à priori rouge, ceux de Sahambaky à la population bleue et ceux de Bekorakaka semblent être issus des 2 populations à priori : bleu et vert.

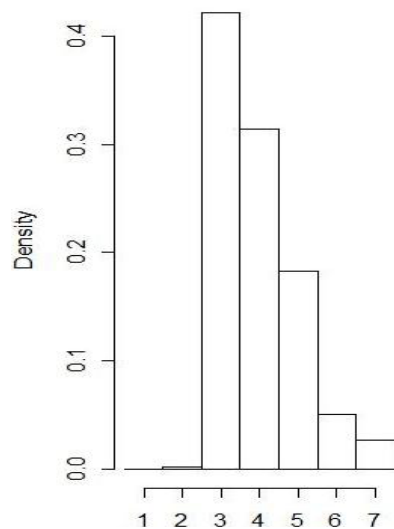


**Figure n°8** : Histogramme des coefficients de membership pour la population de Bekorakaka

- Avec le modèle sans admixture, les histogrammes obtenus n'ont pas montré de structure génétique claire pour la population de Bekorakaka.

- *Structure génétique tenant compte des données spatiales*

En tenant compte les distances géographiques des individus pour voir les probabilités d'appartenance de chacun des individus à un des clusters définis a posteriori, les résultats obtenus avec la valeur de K variant de 1 à 7 ne sont pas très clairs pour définir la structure génétique avec le nombre indéfini de clusters (Figure n°9).

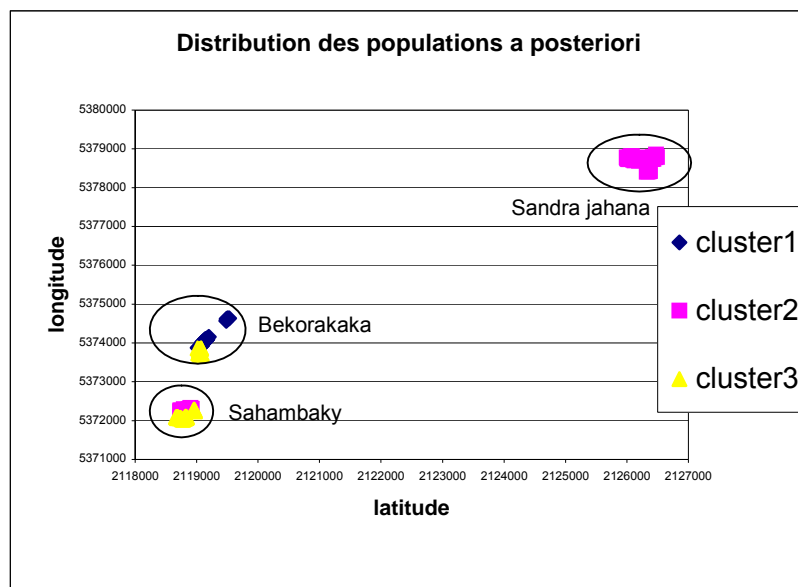


**Figure n°9:** Histogramme des probabilités associées au nombre de clusters inférés

(Modèle D-spatial 200 000 itérations, K=1à 7, 163 individus, 8 loci)

*- Structure génétique tenant compte des données spatiales*

L'histogramme obtenu en tenant compte des distances géographiques des individus avec le modèle D-Spatial est illustré dans le graphique n° 5 suivante. Les résultats ont montré trois types de clusters pour l'ensemble des individus de Bekorakaka. Avec ce nombre de clusters fixé à trois, le modèle donne pour chaque individu les probabilités a posteriori d'appartenir à chacun des cluster. Chaque individu a été alors affecté à un des clusters inférés par le modèle.



**Graphique n°5:** Distribution spatiale des clusters inférés par le modèle D-spatial

D'après le graphique, les clusters 1 et 3 correspondant à des sous populations définies a priori Sahambaky et Bekorakaka ont montré le mélange des individus de ces deux sous populations. La population définie a priori Sandrajahana, est constituée par un seul cluster.

*- Etude des migrants au niveau de population*

L'étude cherche à identifier des migrants putatifs d'une population dans une autre. Avec le nombre fixe de populations ( $K=3$ ) et les valeurs variées du paramètre  $v$  qui indique la probabilité a priori d'un individu d'être migrants d'une population dans une autre ( $v=0,05$  ou  $0,10$  ou  $0,20$ ), les résultats obtenus ont montré un nombre élevé de migrants pour la population exploitée de Bekorakaka. 17 migrants ont été identifiés à Bekorakaka tandis que 2 seulement à Ranomafana (Tableau n°11).

**Tableau n°11 :** Nombre des migrants entre les sous populations à Bekorakaka

Population	Sous population	$v=0.05$	$v=0.10$	$v=0.20$
Bekorakaka	Bekorakaka/ Sahambaky	1	5	5
	Bekorakaka /Sandrajahana	0	4	4
	Sahambaky /Sandrajahana	3	8	8

Le nombre de migrants entre les sous populations de Sandranjahana/Sahambaky est relativement élevé par rapport au deux autres couples malgré l'éloignement de Sandranjahana à Bekorakaka et Sahambaky.

## VII.5- Spatialisation de la diversité génétique à l'échelle locale

L'étude du coefficient d'apparentement ou coefficient de « kinship » de Ritland (1996) en fonction de la distance entre les individus dans différents sous populations sera étudié dans cette partie. Les coefficients de kinship entre individus ont été calculés par paire d'individus entre différents groupes : à savoir entre paires de tous les individus, entre paires d'individus adultes, entre paires d'individus appartenant à la classe des juvéniles et enfin entre paires d'individu adulte-juvenile.

**Tableau n° 12:** Valeurs des coefficients de kinship entre des individus pour deux classes de distance : distance de 30m ( $F_{ij30}$ ) et 50m ( $F_{ij50}$ ), pentes et coefficients de détermination par populations et types de paires formées (paire entre individus adulte, entre juvénile et entre juvénile-adulte)

Population	Sous populations	catégorie	N total	N <sub>30</sub> pairs	$F_{ij30}$	N <sub>50</sub> pairs	$F_{ij50}$	$b_F$	$Sp_{30}$
Bekorakaka	Bekorakaka	Ensemble	50	68	0.037**	82	0.020*	-0.0178***	0.018
		Juvenile	30	20	0.030**	29	0.015*	-0.0224***	
		Adulte	20	14	0.083**	8	0.042*	-0.0196***	
		Juvenile/adulte		28	0.025**	45	0.020**	-0.0196***	
	Sahambaky	Ensemble	52	57	0.0168**	98	0.007**	-0.0128***	0.013
		Juvenile	23	8	-0.109ns	17	-0.084	0.0007ns	
		Adulte	29	16	0.0386*	32	0.0165*	-0.0110*	
		Juvenile/adulte		33	0.0021ns	49	0.0057*	-0.0130***	
	Sandrajahana	Ensemble	44	45	0.0383**	68	0.0070**	-0.0182***	0.019
		Juvenile	18	7	0.0703**	8	0.0607**	-0.0281***	
		Adulte	26	11	0.0693*	30	-0.0310ns	-0.0119*	
		Juvenile/adulte		27	0.0167ns	30	0.0308**	-0.0184***	
Ranomafana	Talatakely	Ensemble	39	59	-0.0046ns	129	0.0127*	-0.0099*	0.010
		Juvenile	13	7	-0.0062ns	13	0.0146ns	-0.0176ns	
		Adulte	26	24	0.00797ns	60	-0.0028ns	-0.00689ns	
		Juvenile/adulte		28	-0.0151ns	56	0.03249*	-0.01124*	
	Vatolampy	Ensemble	43	94	-0.0099ns	92	-0.0194ns	-0.0110***	0.011
		Adulte	38	74	-0.0054ns	72	-0.0156ns	-0.0119***	
		juvenile	5	-	-	-	-	-	
		Juvenile/adulte		-	-	-	-	-	

Valeur significative pour ( $\alpha = 5\%$ ) pour la randomisation de la distribution spatiale des génotypes : ns;  $P > 0.05$ , \*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$  et \*\*\*;  $P < 0.001$ .

$b_F$  pente de régression de  $F_{ij}$  par ln de distance.

La structure génétique spatiale de la population exploitée de Bekorakaka est mieux présentée car 4 valeurs de  $F_{ij30}$  et  $F_{ij50}$  seulement ne sont pas significatif sur les vingtaines de test effectués tandis que pour Ranomafana, 10 sur 12 ne sont pas significatives.

Pour la majorité de situation, les pentes de régression  $r_F$  sont à majorité négative, et le coefficient de corrélation avec la distance décroît. Généralement,  $F_{ij}$  a présenté de valeur positive pour la distance au dessous de 100 m et décroît avec la distance physique (devient de valeur négative). Ce paramètre  $r_F$  est significativement différent de zero pour les 10 situations sur 12 pour Bekorakaka tandis que 2 sur 6 pour Ranomafana

L'estimation du paramètre  $Sp_{30}$  de la population exploitée de Bekorakaka est plus grande par rapport à celle de Ranomafana : respectivement  $Sp_{30}=0.013$  à  $Sp_{30}=0.019$  et  $Sp_{30}=0.010$  à  $Sp_{30}=0.011$ .



## **Chapitre VIII: Diversité de la physiologie de germination et de la croissance juvénile**

Ce chapitre essaie de traiter d'une part les questions posées sur l'influence de la fragmentation et de l'exploitation forestière sur la capacité de reproduction des semenciers au niveau de la germination de leur graines et la croissance juvénile de *Dalbergia monticola* et d'autre part d'analyser la part du déterminisme génétique et environnement dans l'expression de la variabilité de la germination et de la croissance des jeunes plants.

L'étude a été basée en premier lieu sur l'analyse de la variabilité intra et inter provenance de la physiologie de germination de l'espèce à partir de la morphologie, l'anatomie et la germination des graines et en deuxième lieu part la détermination de la variabilité de la croissance juvénile.

Dans cette étude la provenance indique le site de la population où la récolte des graines a été effectuée. Il s'agit de Ranomafana et Bekorakaka.

### **VIII.1- Variabilité intra et inter provenance de la morphologie et anatomie des graines**

Quelques caractéristiques morphologiques et anatomiques des graines ont été étudiées.

#### **VIII.1.1- Diversité morphologique des graines**

La variabilité au niveau de la dimension, du poids des graines pour quelques lots d'individus a été comparée. La couleur du tégument n'a pas été étudiée car elle ne présente pas de grande distinction pour l'ensemble des lots avec ses couleurs marron à marron noirâtre.

##### **- Dimension des graines**

L'observation à l'œil nu de la dimension des graines donne deux catégories de graines dans un même lot : graines à petite taille (3 à 4,5 mm de longueur) et graines à grande taille (de 5 à 7 mm) (photo n°14). L'épaisseur est de l'ordre de 1mm

#### **Photo n°14 : Variabilité morphologique des graines de *Dalbergia monticola***

Les résultats d'analyse de variance des caractères de dimensions des graines effectués sur Xlstat sont résumés dans le tableau ci-après

**Tableau n°13** : Résultats des tests d'analyse de variance des caractères dimensions de graines

Provenance		Bekorakaka		Ranomafana		Anova (inter-prv)	
	Individus	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Individus	Longueur (mm)	Largeur (mm)	
	BA1	5,75 b	3,20 b	RF5	5,45 b	2,75 b	
	BA3	5,70 b	2,60 c	RF10	4,85 b	3,00 b	
	BA4	8,30 a	4,30 a	RF11	5,00 b	2,40 b	
	BA5	7,90 a	3,70 b	RF12	5,40 b	3,00 b	
	BA6	7,75 a	4,00 a	RF13	6,65 a	3,75 a	
	BA8	5,95 b	3,20 b	RF15	7,05 a	3,55 a	
	Moyenne	6,89	3,50		5,73	3,07	6,31 3,28
Anova	F	14,05	14,40		11,39	7,61	7,09 3,37
(intra-prv)	Pr > F	0,003***	0,003***		0,005***	0,014**	0,014** 0,08 NS
	h <sup>2</sup> A	0,963***	0,964***		0,954***	0,929**	
	CV (%)	17,47	17,57		15,80	16,70	

a, b, c : regroupement des valeurs

\*\* : hautement significatif ; \*\*\* : très hautement significatif

NS : non significatif ;

A l'intérieur de chaque provenance, la dimension des graines présente une différence hautement significative. Il y a eu donc variabilité importante sur la taille des graines récoltées entre les individus. Par contre, la comparaison statistique des valeurs entre les deux provenances a montré que les graines se différencient seulement au niveau de leur longueur. Par rapport à des valeurs moyennes, les graines de Bekorakaka sont plus grandes par rapport à celles de Ranomafana. Le taux d'héritabilité génétique hautement à très hautement significative obtenu (0,929 à 0,964) pour les deux caractères longueur et largeur des graines indiquent que la variabilité est généralement expliquée par les variations génétiques, c'est-à-dire d'origine génétique. Apparemment l'état écologique du milieu n'a pas d'effet remarquable sur la dimension des graines pour les deux sites.

#### - Poids de graines

La valeur obtenue en pesant 10 graines répété deux fois par individu (par descendance : lot) et par site a été analysée.

**Tableau n°14** : Résultats des tests d'analyse de variance du caractère poids de graines

Provenance		Bekorakaka		Ranomafana		Anova
	Individus	Poids (mg)	Individus	Poids (mg)		(inter-prv)
	BA1	196,0 c	RF5	131,0 c		
	BA3	159,5 d	RF10	120,0 c		
	BA4	329,5 a	RF11	123,5 c		
	BA5	293,5 b	RF12	177,5 b		
	BA6	255,0 b	RF13	195,0 b		
	BA8	213,5 c	RF15	248,0 a		
	Moyenne	241,7		165,8		203,5
Anova	F	127,62		29,95		11,09
(intra-prv)	Pr > F	0,000***		0,000***		0,003***
	h <sup>2</sup> A	0,952***		0,983***		
	CV (%)	32,65		29,71		

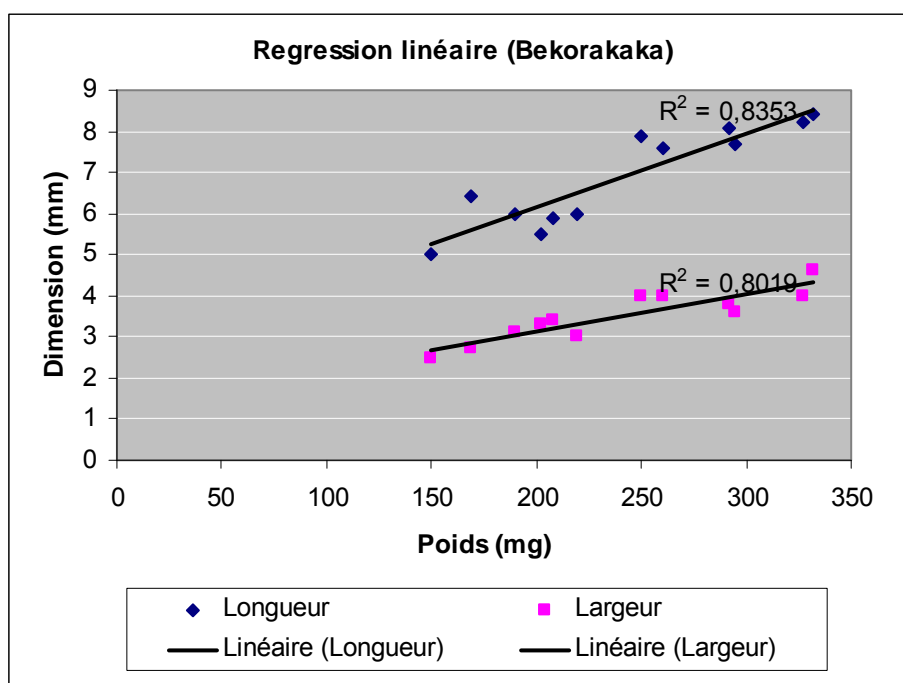
a, b, c, d : regroupement des valeurs

\*\*\* : très hautement significatif

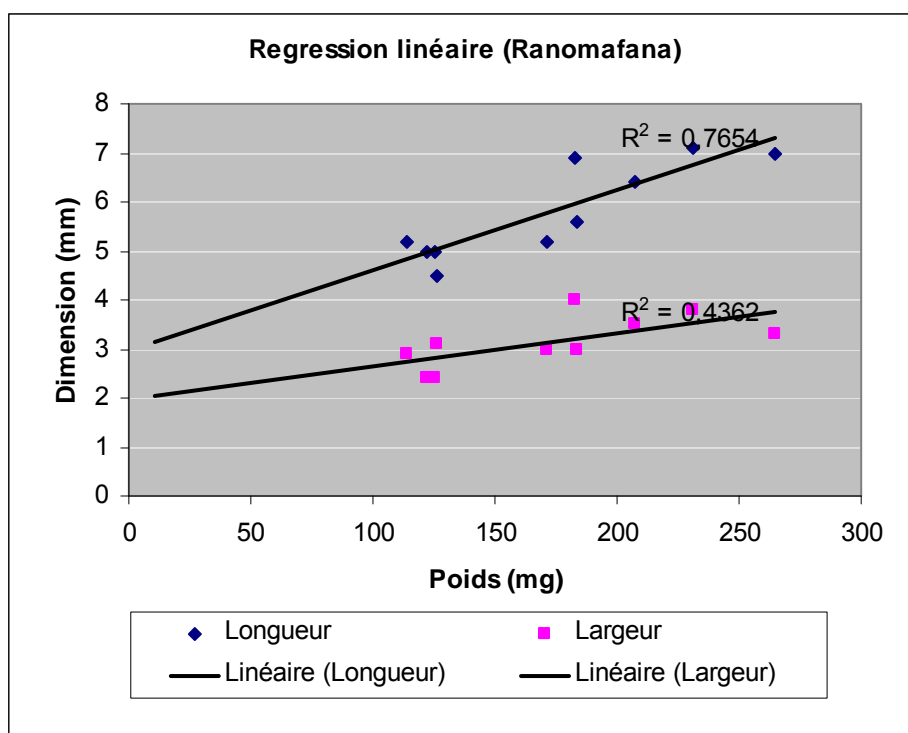
L'étude de la variabilité intra (entre les lots d'individus) et inter provenance a donné des valeurs très significativement variable. Cela peut être expliqué par la variabilité observée au niveau de la dimension des graines. Les valeurs moyennes obtenus entre les deux provenances indiquent que les graines issues de Bekorakaka sont plus lourdes (241,7 / 165,8 mg pour 10 graines). En comparant avec les résultats observés sur la dimension des graines, celles de Bekorakaka présentent de taille supérieure par rapport à celles de Ranomafana. Ainsi, l'étude de la régression linéaire entre les caractères dimension et poids (cf graphique n°7, 8) confirme les corrélations entre les deux caractères avec des coefficients de régression importants pour Bekorakaka (0,835 et 0,801) et moyens pour Ranomafana (0,765 et 0,436).

Le pourcentage des graines de petite taille dans un lot pour Ranomafana peut expliquer aussi cette différence. Les moyennes obtenues sur le comptage effectué avec 6 individus par provenance ont donné le pourcentage de graines de petite taille : 37,5% pour Ranomafana et 30% pour Bekorakaka.

La densité obtenue par extrapolation du poids moyen des 10 graines a donné une variation significative de la quantité par kilo des graines entre les deux provenances. Cela se situe autour de 41 000 pour Bekorakaka et 60 000 graines/kg pour Ranomafana. La variabilité intra lot (intra individu) des dimensions des graines entre les deux provenances peut expliquer cette différence.



**Graphique n°7 :** Droite de régression linéaire entre la dimension (longueur et largeur) et le poids des graines (cas de Bekorakaka)



**Graphique n°8** : Droite de régression linéaire entre la dimension (longueur et largeur) et le poids des graines (cas de Ranomafana)

### VIII.1.2- Diversité anatomique des graines

Deux examens ont été effectués dans cette analyse anatomique des graines. Le premier consiste à observer rapidement la qualité des graines par « cutting test ». Ce dernier a pour but de voir la conformation intérieure des graines pour apprécier l'état de développement de l'embryon et l'endocarpe et l'état de maturité des graines. La deuxième analyse concerne l'étude de variabilité de la teneur en eau des graines après la récolte.

#### - Résultats du cutting test

Deux fois 10 graines par lot (individu) par provenance ont été étudiées en les coupant longitudinalement. Le nombre des graines anatomiquement saines a été compté après et ramené en terme de pourcentage de bonnes graines. Les résultats de ce cutting test sont présentés dans le tableau ci après.

**Tableau n°15** : Résultats de « cutting test »

Provenance	Bekorakaka		Ranomafana		Anova (inter-prv)
	Individus	Cutting test (%)	Individus	Cutting test (%)	
	BA1	65,0 c	RF5	55,0 b	
	BA3	70,0 b	RF10	60,0 b	
	BA4	95,0 a	RF11	65,0 b	
	BA5	80,0 b	RF12	65,0 b	
	BA6	85,0 b	RF13	70,0 b	
	BA8	75,0 b	RF15	90,0 a	
	Moyenne	78,33		67,50	72,50
Anova (intra-prv)	F	3,50		11,80	5,232
	Pr > F	0,080 NS		0,005***	0,032*
	h <sup>2</sup> A	0,833 NS		0,955***	
	CV (%)	15,23		18,00	

NS : non significatif

\* : significatif, \*\*\* : très hautement significatif

a,b,c : groupement selon Newman-Keuls

L'analyse statistique des données a montré de différence significative entre les valeurs de cutting test pour Ranomafana. Par contre, les pourcentages obtenus des tests pour chaque individu de Bekorakaka ne sont pas significativement différents. Cela peut signifier que les graines issues des individus de Bekorakaka ont généralement le même pourcentage de bonnes graines. La valeur importante de h<sup>2</sup>A obtenue pour Ranomafana indique que la variabilité observée y semble être d'origine génétique tandis que pour Bekorakaka il y a eu un certain effet du milieu.

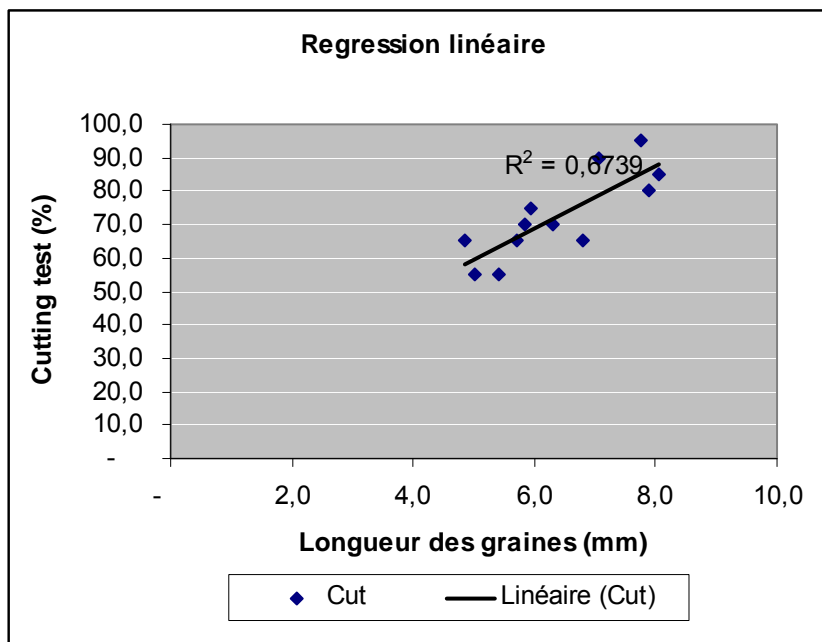
L'analyse des tests entre les deux provenances a donné des valeurs moyennes significativement différentes. Les graines provenant de Bekorakaka semblent avoir une meilleure qualité physiologique par rapport à celles de Ranomafana avec un pourcentage de 78,33% de bonnes graines. La couleur et l'épaisseur de l'endocarpe indique à première vue la qualité des graines pour *Dalbergia monticola*. La bonne qualité physiologique pour l'espèce est marquée par la couleur verte de l'endocarpe et vert jaunâtre à vert blanchâtre de l'embryon après la récolte et la taille moyenne de 1 mm d'épaisseur. Par contre, la mauvaise qualité observée dans les lots de Ranomafana est marquée par une faible épaisseur des graines ( $\leq 0,5$  mm).

L'exposition des arbres semenciers dans la forêt a de rôle important sur le développement et la maturation des graines. Pour le cas de Bekorakaka, la diminution de la densité d'arbres (dû à l'exploitation) entraînant l'ouverture de la canopée du peuplement a d'effets positif. Généralement les graines issues de Bekorakaka ont eu de bonne conformation des graines (épaisseur et dimension) tandis que celles de Ranomafana ont présenté de taille fine et petite (tant les cotylédons que l'embryon).

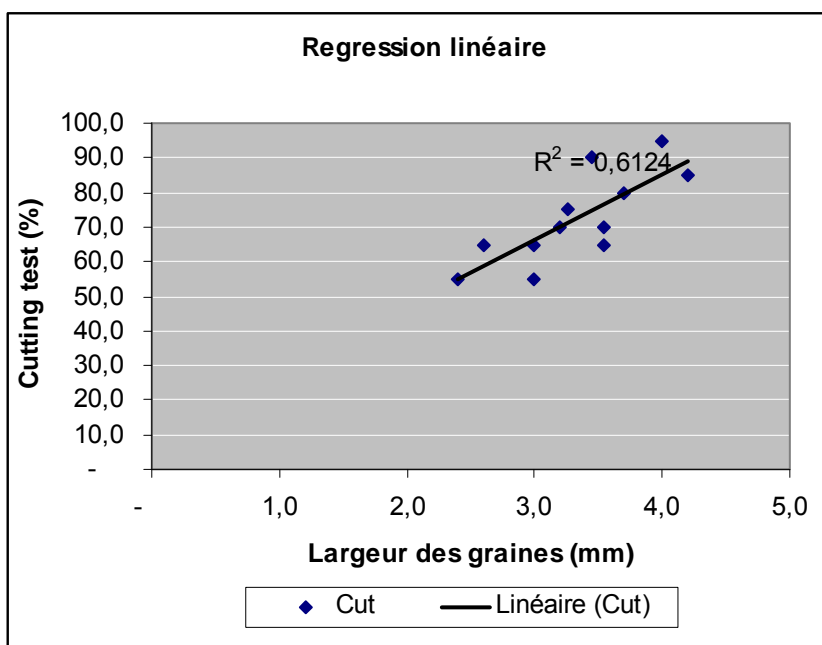
La mauvaise qualité de certaines graines lors de la récolte est parfois liée au dessèchement de certaines graines qui est observé depuis les phases de la formation et maturation des fruits. Le changement brusque du microclimat du milieu écologique lors de ces périodes a été un des facteurs

qui entraîne ce dessèchement précoce (humidité suivi d'une longue période chaude et sèche de 2 à 3 semaines au mois de Décembre et Janvier).

L'étude des corrélations entre dimensions (largeur et longueur) et cutting test a donné les résultats illustrés dans les graphiques suivants :



**Graphique n°9** : Droite de régression linéaire entre longueur des graines et cutting test.



**Graphique n°10** : Droite de régression linéaire entre largeur des graines et cutting test.

Les droites de régression obtenues sur l'analyse de corrélation ont données des coefficients de régression autour de 0,65. Cela indique l'existence de corrélation entre les deux examens effectués. L'observation morphologique des graines (en particulier la taille) peut indiquer à l'avance la qualité physiologique des graines, mais cela reste à vérifier par cutting test.

#### - Etude de la teneur en eau

La teneur en eau correspond au pourcentage d'humidité par rapport au poids humide des graines. L'objet de l'étude est de connaître la variation de ce caractère au niveau de chaque individu vu la variation obtenue sur cutting test. Les valeurs de la teneur en eau ont été mesurées 2 jours après la récolte, c'est-à-dire après l'extraction des graines de leurs gousses.

**Tableau n°16** : Résultats d'analyse de la teneur en eau

Provenance	Bekorakaka		Ranomafana		Anova (inter-prv)
	Individus	Teneur en eau (%)	Individus	Teneur en eau (%)	
	BA1	7,90 b	RF5	11,41 b	
	BA3	11,0 b	RF10	9,95 b	
	BA4	9,84 b	RF11	7,05 c	
	BA5	13,25 a	RF12	8,84 b	
	BA6	11,50 a	RF13	12,49 a	
	BA8	10,15 b	RF15	11,03 b	
	Moyenne	10,60		10,13	10,37
Anova	F	7,63		11,36	0,378
(intra-prv)	Pr > F	0,014 *		0,005 **	0,545 NS

La teneur en eau des graines de *Dalbergia monticola* après la récolte a présenté de différence significative à l'intérieur de chaque provenance. Par contre, la comparaison des valeurs obtenues entre les deux provenances n'a pas montré de différence. Cela peut être expliqué par l'état du microclimat du milieu lors de la récolte car généralement la période de récolte est située pendant la période de pluie. Généralement, la teneur en eau des graines observée dans les deux sites est située entre 7 et 13%. Malgré cela, le séchage à l'air ambiant des graines pendant 5 à 6 jours permet d'avoir une teneur en eau située entre 6 et 8 % pour l'espèce. Cette dernière correspond à de teneur en eau de conservation de certaines graines de légumineuses (Kameswara, 2006).

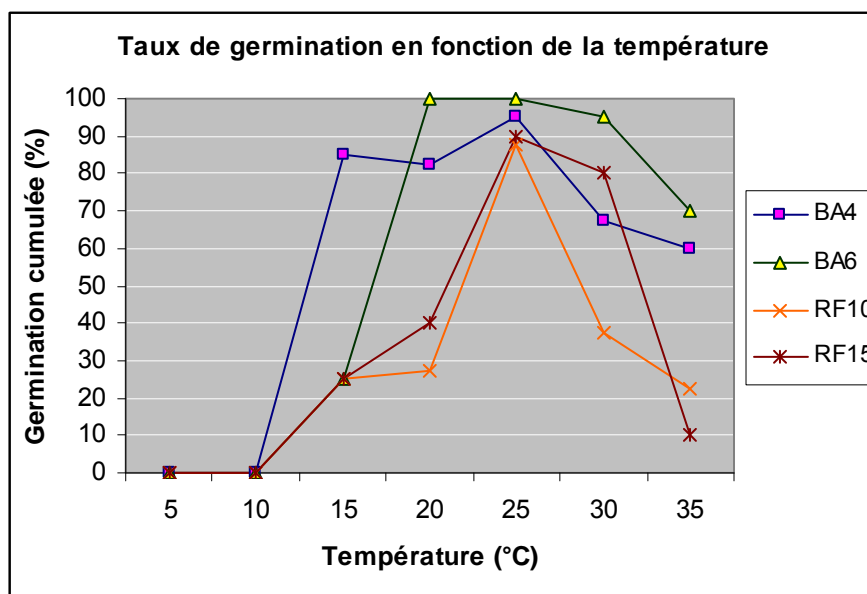
#### VIII.2- Variabilité intra et inter provenance du taux de germination

La germination en fonction de la température et de la teneur en eau sera étudiée dans cette partie.

### VIII.2.1- Germination en fonction de la température

Après l'analyse morphologique et anatomique, deux lots (individus) provenant de Bekorakaka et deux lots de Ranomafana présentant de nombre suffisant des graines de bonne qualité ont été utilisés pour les tests de germination.

Selon la disponibilité des graines et des matériels nécessaires pour les essais de germination (incubateurs), 7 niveaux de température ont été testés pour connaître la réaction des graines dans l'étude de la germination. Ils varient de 5 à 35°C. Ils ont été choisis pour connaître la température minimale, maximale et optimale de germination de l'espèce. Les individus BA4 et BA6 pour Bekorakaka et RF10 et RF 15 pour Ranomafana ont eu le nombre suffisant des graines et ont été utilisés pour les essais. Les résultats obtenus de ce test sont illustrés dans le graphique n°11.



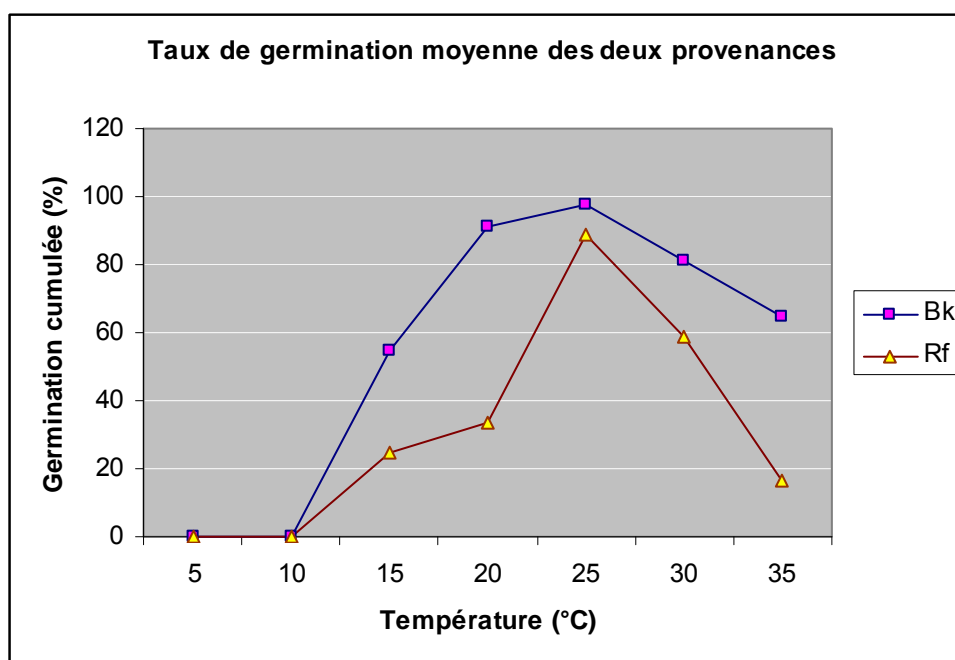
**Graphique n°11** : Variation du taux de germination en fonction de la température  
(BA : Bekorakaka ; RF : Ranomafana)

La température inférieure à 10°C ne déclenche pas la germination des graines. Elle semble bloquer le processus de germination des graines de l'espèce. Ces dernières sont presque endommagées après 10 à 12j jours de test. Les tests effectués à 15°C ont donné un taux de germination cumulé variant de 12,5 à 85% pour les deux provenances avec un délai de germination de 14 à 16 jours. Le début de levée à ce niveau de température a été observé au huitième jour du test.

Ces résultats indiquent que la température minimale de base de germination pour l'espèce semble se situer entre 10 à 15°C. Le taux de germination maximal a été obtenu à des températures de 20 à 25°C. Cela arrive à 100% pour le lot BA6 provenant de Bekorakaka avec un délai de germination de 10 jours. Le taux de germination cumulé diminue progressivement entre 25 à 35°C. Cela peut être



traduit par les caractéristiques climatiques de la zone écologique de l'espèce indiquant une température maximale de 27°C. Le graphique suivant représente le taux moyen de germination entre les provenances.



**Graphique n°12** : Variation moyenne du taux de germination pour les deux provenances (Bk : Bekorakaka et Rf : Ranomafana)

Le taux moyen de germination est important pour la provenance de Bekorakaka (jusqu'à 97,5 %). A chaque niveau de température, les taux de germination de Bekorakaka semblent supérieurs à ceux de Ranomafana. Cela reflète les résultats obtenus sur les cutting test (cf Tableau n°15) indiquant la meilleure qualité physiologique des graines issues de Bekorakaka. Le tableau ci après résume les résultats d'analyse de variance du taux de germination entre les deux provenances à chaque niveau de température

**Tableau n°17** : Résultats d'analyse de variance inter provenance du taux de germination moyen

Taux de germination moyen							
Provenance	Température						
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
<b>Bekorakaka</b>	0	0	55	90,8	97,3	80,8	65,0
<b>Ranomafana</b>	0	0	25	33,3	87,3	58,3	16,6
Moyenne			40,0	62,08	92,8	69,58	40,83
F	-	-	3,00	85,01	28,87	2,36	108,51
Pr > F			0,158 NS	0,001 ***	0,006 **	0,199 NS	0,000 ***

D'après ce tableau d'analyse, des différences significatives sont observées pour trois niveaux de température entre les deux provenances (20, 25 et 35°C). Les résultats montrent l'importance du taux de germination des graines de Bekorakaka dans les cinq conditions de milieu. Cela peut traduire que les graines issues de cette forêt exploitée de Bekorakaka ont plus de capacité de germination par rapport à celles de la forêt peu perturbée de Ranomafana. La meilleure qualité physiologique des graines (dimension, poids, anatomie) de cette provenance de Bekorakaka peut expliquer leur performance en germination.

#### Etude du temps moyen de germination (TMG)

Il s'agit du temps correspondant au délai moyen mis pour l'ensemble des graines dans un lot à germer.

L'analyse globale des données a montré que les températures 25° et 30°C ont donné les meilleurs résultats pour le temps moyen de germination. Le temps moyen mis par les graines pour germer est de 5,6 jours à 25°C et de 4,9 jours à 30°C. Ces deux valeurs obtenues des deux températures n'ont pas de différence du point de vue statistique. Mais le taux de germination 100% obtenue à 25°C montre que la condition est meilleure à cette température qui semble être donc plus rapprochée des conditions naturelles de levée des graines.

L'étude du temps de germination moyen entre les deux provenances a été effectuée à partir des résultats obtenus à 25°C.

Pour Bekorakaka ce temps moyen varie entre 4,8 et 6,5 jours tandis que pour Ranomafana cela varie entre 5,7 et 7,7 jours. La germination des graines de Bekorakaka prend plus d'avance par rapport à Ranomafana. Encore une fois, la meilleure qualité physiologique des graines de ce site observée depuis la phase de cutting test peut constituer une explication. Cette qualité physiologique des graines facilite les processus de germination. Il s'agit de l'absorption d'eau par la graine, de la reprise des activités enzymatiques utilisant les éléments nutritifs mis en réserve et des divisions cellulaires entraînant l'apparition accélérée de la radicule et de la tige.

Au niveau du temps de levée, pour les deux provenances, la première levée a été observée au troisième jour après le semis. Cela était vérifié au niveau du laboratoire et à la pépinière ex-situ. La durée maximale de levée pour les graines se trouve au 14<sup>ème</sup> jour pour Bekorakaka et 15<sup>ème</sup> pour Ranomafana.

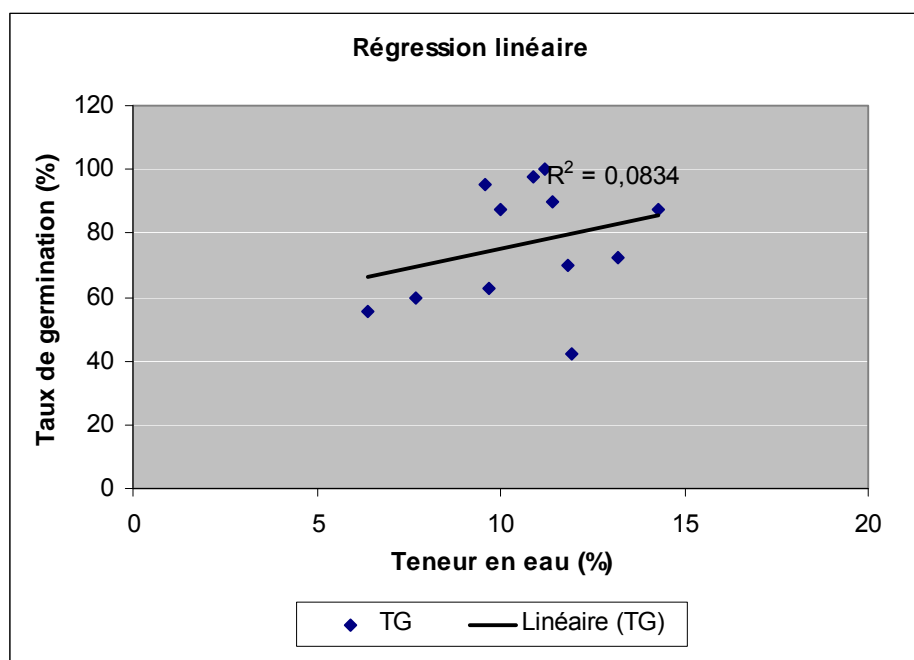
#### **VIII.2.2 - Germination en fonction de la teneur en eau**

L'étude concerne la variation du taux de germination en fonction de la teneur en eau des graines juste après la récolte. Les lots (individus) étudiés sont ceux qui ont le nombre suffisant de graines pour l'expérimentation. Cette dernière a été effectuée à 25°C (température proche de celle de la caractéristique du milieu écologique de l'espèce) qui correspond à la valeur identifiée comme étant la plus favorable à la germination.

**Tableau n°18** : Taux de germination en fonction de la teneur en eau (à 25°C)

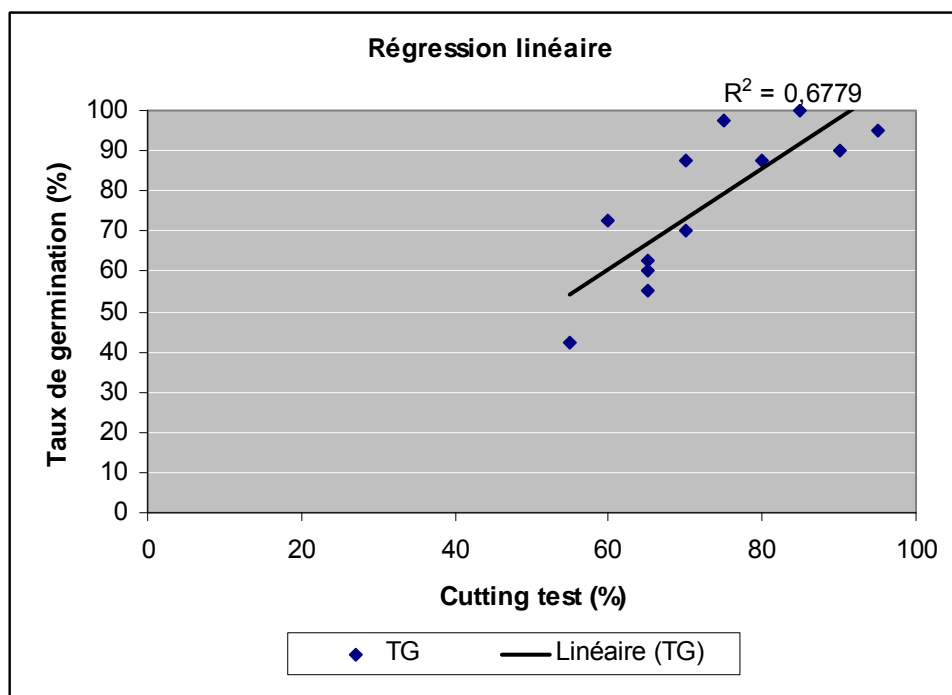
Provenance	Individus	Teneur en eau (%)	Taux de germination	Moyenne / provenance	Intra-prov F Pr > F
Bekorakaka	BA1	7,70	60,00	85,00	3,871 0,015 *
	BA3	11,82	70,00		
	BA4	9,58	95,00		
	BA5	14,31	87,50		
	BA6	11,20	100,00		
	BA8	10,90	97,50		
Ranomafana	RF5	11,94	42,50	68,33	6,240 0,002 **
	RF10	10,01	87,50		
	RF11	6,40	55,50		
	RF12	9,71	62,50		
	RF13	13,19	72,50		
	RF15	11,39	90,00		
Moyenne			76,66		
Anova	F		7,69		
(inter-pvn)	Pr > F		0,008 **		

Les valeurs moyennes obtenues sur le taux de germination à l'intérieur et entre les provenances ont montré de différence significative. La variabilité pour la provenance de Ranomafana est hautement significatif par rapport à Bekorakaka ( $Pr > F$  0,002 \*\*). La teneur en eau des graines après la récolte, apparemment variable, a été donc favorable à leur germination. Ainsi, l'analyse de la courbe de tendance entre les teneurs en eau et les taux de germination n'a pas montré de liaison entre les deux caractéristiques (coefficient de régression  $R^2 = 0,0834$ ). Il apparaît alors que le taux de germination des graines de l'espèce après la récolte ne dépend pas de la teneur en eau mais avec la température du milieu de germination et la qualité physiologique des graines.

**Graphique n°13** : Droite de régression linéaire entre teneur en eau et taux de germination des graines

### VIII.2.3 – Corrélation entre le taux de germination et la qualité physiologique des graines

L'étude par régression linéaire de taux de germination et les résultats de cutting test a permis de voir la corrélation entre les deux paramètres.

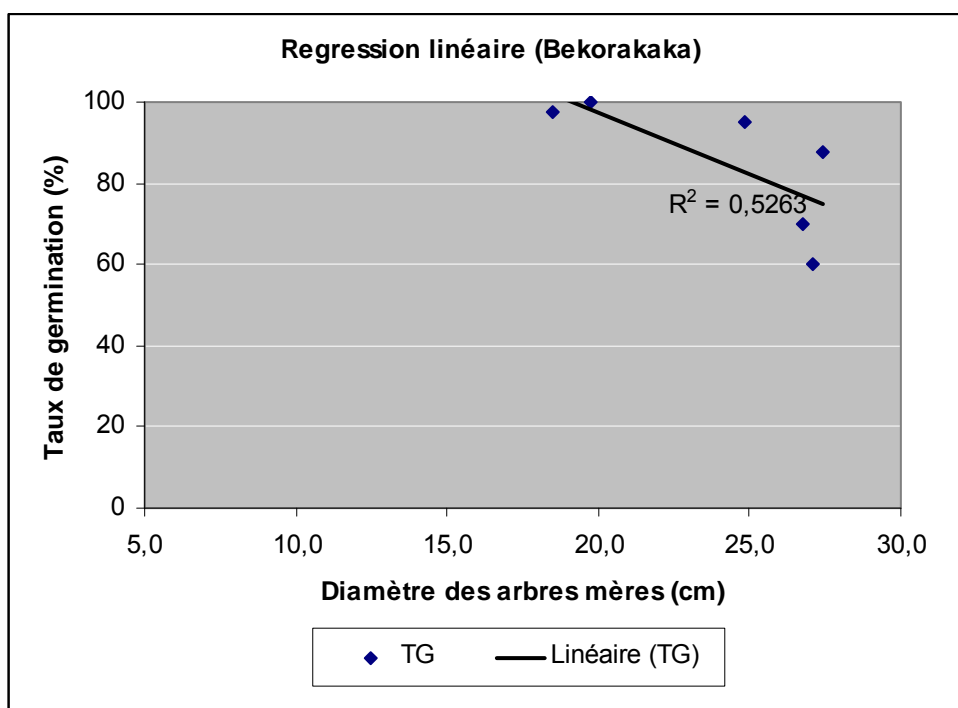


**Graphique n°14** : Droite de régression linéaire entre les taux de germination des graines et les pourcentages de cutting test

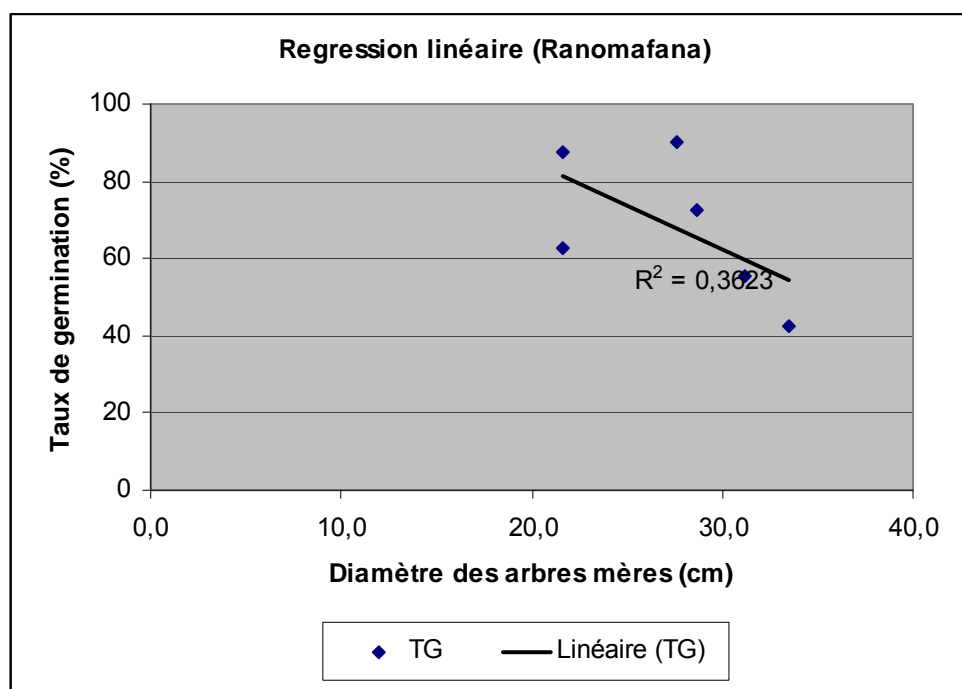
Pour l'ensemble des données issus de graines des deux provenances, le coefficient de régression obtenu ( $R^2 = 0,677$ ) semble indiquer de corrélation positive entre les valeurs de cutting test et le taux de germination. Cela signifie que pour *Dalbergia monticola*, le pourcentage de cutting test pourrait indiquer à l'avance un certain taux de germination de ses lots de graines.

### VIII.2.4 – Corrélation entre la taille des arbres mères et le taux de germination

Cette étude a été effectuée pour voir si la performance de la germination dépend de la taille des arbres mères.



**Graphique n°15** : Droite de régression linéaire entre les taux de germination et la taille des arbres mères à Bekorakaka



**Graphique n°16** : Droite de régression linéaire entre les taux de germination et la taille des arbres mères à Ranomafana.

Les coefficients de corrélation obtenus pour les deux provenances indiquent la présence de corrélation entre la taille des arbres mères et le taux de germination. Elle est moyen pour Bekorakaka ( $R^2=0,526$ ) et faible pour Ranomafana (0,362). Par contre les pentes des deux courbes indiquent que le

taux de germination semble inversement proportionnel à la taille des arbres. C'est-à-dire, les jeunes arbres mères présentent le meilleur taux de germination par rapport aux adultes.

### VIII.3- Variabilité intra et inter provenance de la croissance juvénile

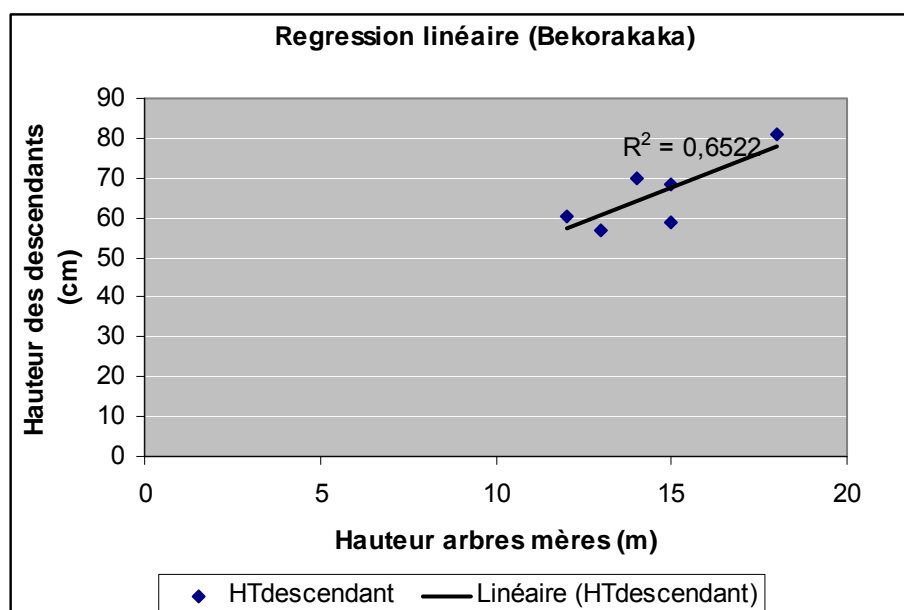
La variabilité entre les individus et entre les deux provenances (Ranomafana et Bekorakaka) a été étudiée dans cette partie. Aussi, l'héritabilité génotypique des caractères obtenue à partir des valeurs moyennes par provenances a été évaluée et interprétée.

#### VIII.3.1- Analyse de variance et d'héritabilité génotypique

Quatre caractères ont été étudiés à savoir la hauteur totale, la hauteur de l'hypocotyle, le nombre de feuilles développées et le nombre de folioles (de la dernière feuille développée). Les données étudiées concernent cinq mesures prises pendant 3 mois de suivi. Les résultats d'analyse obtenus sur les deux provenances sont résumés dans le tableau n°18 tandis que les valeurs moyennes obtenues au niveau de chaque individu sont présentées en annexe.

##### - Comparaison intra provenance

Parmi les caractères étudiés, la hauteur totale des plantules a présenté de différence significative durant les 3 mois de mesure notamment pour les deux provenances. L'héritabilité génétique de ce caractère est très hautement significative depuis le début de la croissance ( $h^2_A > 0,930$ ) pour Bekorakaka tandis qu'à Ranomafana, les valeurs sont moyennes à hautement significatives (de 0,769 à 0,834). Cela signifie que la variabilité de la croissance en hauteur est d'origine génétique. Ainsi l'étude de corrélation entre la hauteur des descendants et la taille des arbres mères indique une certaine liaison entre ces caractéristiques.

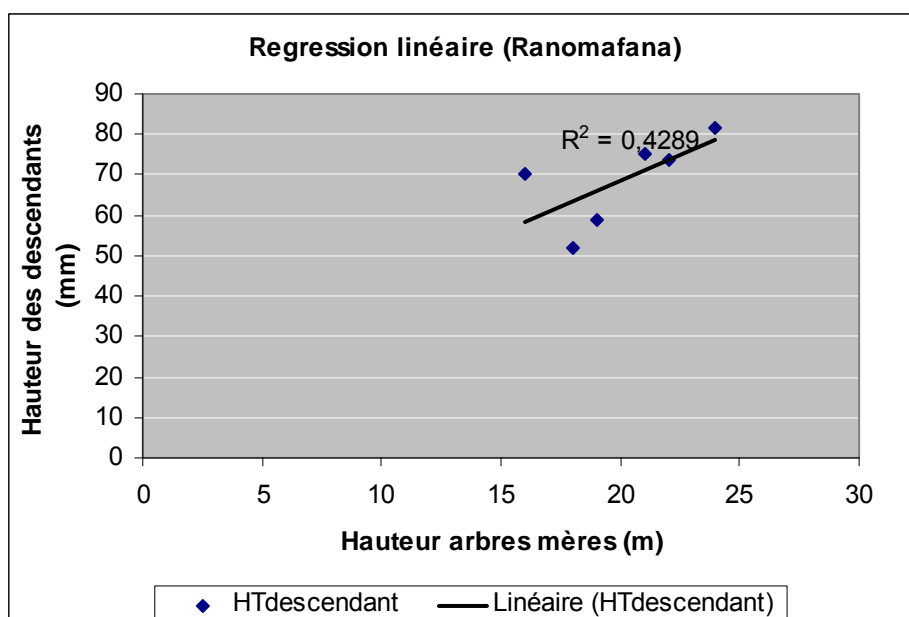


**Graphique n°17** : Droite de régression linéaire entre hauteurs des arbres mères à Bekorakaka et hauteur des descendant .

**Tableau n°19** : Résultats d'analyse de variance et d'héritabilité des caractères

<b>Crc</b>	<b>An\ Prv</b>	<b>Bekorakaka</b>					<b>Ranomafana</b>				
		<b>15j</b>	<b>30j</b>	<b>45j</b>	<b>60j</b>	<b>90j</b>	<b>15j</b>	<b>30j</b>	<b>45j</b>	<b>60j</b>	<b>90j</b>
<b>HT (mm)</b>	Moyenne	36,00	40,75	46,81	52,53	65,93	36,50	43,33	47,41	53,86	68,66
	F	15,89	18,83	30,54	14,21	14,72	5,01	5,39	5,87	6,03	4,33
	Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,000	0,0001	0,010	0,008	0,006	0,005	0,017
	h <sup>2</sup> <sub>A</sub>	0,937***	0,946***	0,967***	0,929***	0,932***	0,800*	0,814**	0,829**	0,834**	0,769*
	CVp (%)	14,7	14,2	13,1	13,9	13,7	15,90	15,08	17,22	16,19	18,93
<b>Hhyp (mm)</b>	Moyenne	21,64	23,17	25,48	27,28	28,01	20,39	22,09	22,70	24,12	26,30
	F	7,75	6,632	8,24	9,89	6,83	2,70	2,36	2,46	2,76	1,61
	Pr > F	0,002	0,004	0,001	0,001	0,003	0,074	0,103	0,093	0,069	0,230
	h <sup>2</sup> <sub>A</sub>	0,871**	0,849**	0,876***	0,898***	0,853**	0,629	0,577	0,594	0,638	0,380
	CVp (%)	14,10	14,88	12,55	12,34	11,94	14,88	13,14	13,18	12,93	13,10
<b>NFE</b>	Moyenne	2,16	2,78	3,92	4,84	5,34	2,65	3,66	4,50	5,69	6,74
	F	25,28	6,01	1,78	5,83	4,56	2,68	5,03	6,10	8,66	5,85
	Pr > F	0,0001	0,005	0,191	0,006	0,015	0,075	0,005	0,005	0,001	0,006
	h <sup>2</sup> <sub>A</sub>	0,960***	0,833**	0,438	0,828**	0,780*	0,626	0,801**	0,836**	0,883***	0,829**
	CVp (%)	10,78	15,26	18,00	13,86	17,88	25,24	14,29	17,09	14,51	17,44
<b>NFO</b>	Moyenne	6,86	7,53	9,42	11,22	12,80	6,78	9,29	10,70	12,63	16,57
	F	6,65	6,91	5,57	5,95	5,54	1,98	9,19	15,10	15,15	4,39
	Pr > F	0,003	0,003	0,007	0,005	0,007	0,153	0,001	0,000	0,000	0,017
	h <sup>2</sup> <sub>A</sub>	0,849**	0,855**	0,820**	0,831**	0,819**	0,496	0,891***	0,938***	0,934***	0,772*
	CVp (%)	5,55	6,49	6,58	9,67	11,25	4,15	9,57	11,35	8,88	8,76

**HT** : hauteur total ; **Hhyp** : hauteur d'hypocotyle ; **NFE** : nombre de feuilles développées ; **NFO** : nombre de foliole de la dernière feuille développée ; **Crc** : caractères étudiées ; **Anl** : résultats d'analyse ; **Prv** : provenance ; **F** : variable de Fisher ; **Pr >** probabilité retour ; **h<sup>2</sup><sub>A</sub>** : héritabilité génotypique ; **CVp (%)** : coefficient de variation, 15j ... : mesure effectuée au 15<sup>ème</sup> jour



**Graphique n°18** : Droite de régression linéaire entre hauteurs des arbres mères à Ranomafana et hauteur des descendant

Les coefficients de régression ont eu des valeurs respectives de 0,652 et 0,428 pour Bekorakaka et Ranomafana. Cela peut expliquer la légère différence au niveau des valeurs d'héritabilité entre Bekorakaka et Ranomafana. Par suite de l'étude, l'analyse de corrélation entre ce caractère hauteur total et le caractéristique morphologique des graines de provenance de ces descendants a montré un coefficient de corrélation modéré pour Bekorakaka ( $R^2 = 0,542$ ) tandis que pour Ranomafana la valeur est presque nulle (0,04).

Concernant la hauteur de l'hypocotyle, les valeurs obtenues semblent avoir une différence significative durant les trois mois de la croissance pour les individus de Bekorakaka. Par contre, il n'en est de même pour Ranomafana. Les valeurs d'héritabilité génétique y sont faibles (entre 0,380 à 0,638). Ce caractère semble alors influencé par le milieu pour les descendants de Bekorakaka tandis que ceux de Bekorakaka, les valeurs de  $h^2_A$  sont hautement à très hautement significatives. La variabilité au niveau des descendants de Bekorakaka peut être donc expliquée par de variation génétique.

Pour les caractères végétatifs, la variabilité du nombre des feuilles est très hautement significative au début du développement de la plantule et diminue vers le troisième mois pour le cas de Bekorakaka. Par contre à Ranomafana, la variabilité est hautement à très hautement significative sauf au début de mesure (15j). L'héritabilité génétique semble diminuer avec le temps pour Bekorakaka tandis que pour Ranomafana les valeurs augmentent et deviennent très hautement significatives à deux mois (0,883\*\*\*). D'après ces résultats, ce caractère végétatif est apparemment héritable au début de la phase de développement de la plantule.



Concernant le nombre de foliole, les valeurs moyennes obtenues à chaque mesure sont significativement différentes pour le cas de Bekorakaka. L'héritabilité génétique fluctue entre 0,819 à 0,855 et reste hautement significatif. Pour Ranomafana, ce caractère a présenté des valeurs moyennes intra provenances très différentes pendant les deux premiers mois sauf au 15<sup>ème</sup> jour de comptage. Parallèlement, les valeurs de l'héritabilité  $h^2_A$  sont hautement à très hautement significatives durant ce temps. Cela permet de dire qu'il y a une dépendance génétique de ce caractère végétatif au début de la croissance de la plantule. Au 3<sup>ème</sup> mois de développement, une diminution de taux d'héritabilité a été remarquée avec  $h^2_A = 0,772$  mais il reste significatif. La variabilité du nombre de foliole chez les descendants de l'espèce est donc généralement d'origine génétique

D'après ces résultats, le nombre de folioles de l'espèce à l'état juvénile augmente avec l'âge. Elle passe de 5 à 15 pour Bekorakaka et de 5 à 19 pour Ranomafana pendant 3 mois. Il est à noter que le nombre de folioles de *Dalbergia monticola* arrive à 20- 25 voir 30 à l'état adulte (diamètre supérieur à 20 cm).

#### - Analyse inter provenances

La comparaison des résultats entre les deux provenances a été effectuée à partir des valeurs obtenues à 90j de croissance juvénile des plants.

**Tableau n°20** : Résultats d'analyse de variance entre les deux provenances

	Ht 90j (mm)	Hyp90 (mm)	NFE90j (mm)	NFO90j (mm)
Bekorakaka	65,93	28,01	5,34	12,80
Ranomafana	68,66	26,30	6,74	16,57
Moyenne	67,30	27,16	6,04	14,68
F	0,535	2,270	15,38	61,03
Pr > F	0,464 NS	0,141 NS	0,000 ***	0,000 ***

**Ht 90j** : hauteur total à 3mois ; **Hyp90j** : hauteur de l'hypocotyle à 3mois ; **NFE90j** : nombre des feuilles à 3mois, **NFO90j** : nombre de folioles à 3mois

Les deux caractères de croissance (hauteur totale et hauteur de l'hypocotyle) n'ont pas montré de différence significative (Pr > F 0,464 et 0,141) entre les deux provenances avec une croissance en hauteur près de 6 à 8 cm et d'hauteur de l'hypocotyle de 2 à 3cm à l'âge de trois mois. Cela signifie que le facteur provenance n'a pas d'effet remarquable sur la croissance juvénile en pépinière de l'espèce. Pour les caractères végétatifs, les valeurs moyennes obtenues entre les deux provenances indiquent qu'il y a une différence très significative au niveau du nombre de feuilles et du nombre de folioles développées durant les trois premiers mois de développement de la plantule. L'héritabilité génétique de ces caractères végétatifs permet d'expliquer cette variance entre les deux provenances. Il reste significatif (hautement significatif) durant la phase de croissance juvénile. Cela peut déjà

entraîner des différences entre les deux provenances. Au troisième mois, la diminution des valeurs de l'héritabilité génétique indique apparemment l'apparition de l'effet de l'environnement. L'étude des corrélations entre les caractères suivant peut permettre aussi d'avancer des explications.

### **VIII.3.2- Corrélation entre les caractères**

Les corrélations entre les quatre caractères ont été étudiées par provenance à partir des valeurs par individus pour les cinq mesures effectuées. Il s'agit des caractères de croissance (hauteur total et hauteur de l'hypocotyle) et des caractères végétatifs (nombre de feuilles et nombre de folioles observé sur la dernière feuille développée). Les résultats obtenus sur Xlstat 2008 sont présentés sous forme de matrice.

#### Pour Bekorakaka

Les caractères de croissance (HT et Hhyp) sont fortement corrélés durant les deux premiers mois de développement des plantules de l'espèce avec des coefficients de corrélation variant entre 0,733 et 0,975. Au troisième mois, ces coefficients descendent jusqu'à 0,561. Cela peut être traduit par une diminution de la vitesse de la croissance de l'hypocotyle à partir de ce temps tandis que celle de la hauteur totale continue à augmenter (cf tableau n°20).

Concernant les caractères végétatifs, le nombre de feuilles (NFE) et le nombre de folioles (NFO) développés ont généralement présenté de coefficients de corrélation significatifs sauf au 45<sup>ème</sup> jour. Cela peut être expliqué par l'absence de variation du nombre de feuilles entre les plantules lors de cette période de mesure (cf tableau n°18). Ces caractéristiques sont donc moyennement corrélées. Cela peut signifier que l'augmentation du nombre de feuille développé suivant l'âge des plantules correspond à un certain développement du nombre de folioles.

Entre les caractères de croissance (Ht et Hhyp) et les caractères végétatifs (NFE et NFO), le nombre de feuilles développées seulement a montré des coefficients de corrélations significatifs avec le caractère hauteur totale durant les deux premiers mois de croissance mais cela devient faible au 3<sup>ème</sup> mois de croissance. La croissance en hauteur de la plantule peut être donc traduite au développement du nombre des feuilles de la plantule. D'après les observations, les feuilles apparaissent au sommet entre les phases d'élongation de la plante durant cette première phase de développement juvénile. L'apparition des feuilles est observée sur le bourgeon terminal de la plante et le nombre des feuilles qui y se développent sont apparemment variable (simple ou double).

**Tableau n°21** : Matrice de corrélation (Pearson) pour Bekorakaka

Variable	HT15j	HT30j	HT45j	HT60j	HT90j	Hhy15	Hhy30	Hhy45	Hhy60	HHy90	NFE15	NFE30	NFE45	NFE60	NFE90	NFO15	NFO30	NFO45	NFO60	NFO90
HT15j	1																			
HT30j	<b>0,975</b>	1																		
HT45j	<b>0,974</b>	<b>0,976</b>	1																	
HT60j	<b>0,956</b>	<b>0,957</b>	<b>0,982</b>	1																
HT90j	<b>0,842</b>	<b>0,850</b>	<b>0,889</b>	<b>0,918</b>	1															
Hhy15	<b>0,897</b>	<b>0,906</b>	<b>0,842</b>	<b>0,808</b>	<b>0,605</b>	1														
Hhy30	<b>0,830</b>	<b>0,869</b>	<b>0,784</b>	<b>0,733</b>	<b>0,557</b>	<b>0,972</b>	1													
Hhy45	<b>0,859</b>	<b>0,880</b>	<b>0,813</b>	<b>0,745</b>	<b>0,559</b>	<b>0,962</b>	<b>0,973</b>	1												
Hhy60	<b>0,859</b>	<b>0,874</b>	<b>0,817</b>	<b>0,767</b>	<b>0,562</b>	<b>0,975</b>	<b>0,962</b>	<b>0,964</b>	1											
HHy90	<b>0,839</b>	<b>0,858</b>	<b>0,794</b>	<b>0,755</b>	<b>0,561</b>	<b>0,949</b>	<b>0,946</b>	<b>0,942</b>	<b>0,987</b>	1										
NFE15	<b>0,879</b>	<b>0,891</b>	<b>0,888</b>	<b>0,860</b>	<b>0,753</b>	<b>0,786</b>	<b>0,707</b>	<b>0,743</b>	<b>0,718</b>	<b>0,660</b>	1									
NFE30	<b>0,773</b>	<b>0,777</b>	<b>0,797</b>	<b>0,776</b>	<b>0,660</b>	<b>0,650</b>	<b>0,571</b>	<b>0,638</b>	<b>0,645</b>	<b>0,621</b>	<b>0,840</b>	1								
NFE45	<b>0,553</b>	<b>0,528</b>	<b>0,487</b>	<b>0,522</b>	0,418	<b>0,525</b>	0,420	0,420	<b>0,531</b>	<b>0,558</b>	<b>0,530</b>	<b>0,574</b>	1							
NFE60	<b>0,654</b>	<b>0,666</b>	<b>0,738</b>	<b>0,787</b>	<b>0,817</b>	0,421	0,310	0,301	0,367	0,335	<b>0,682</b>	<b>0,713</b>	0,415	1						
NFE90	0,446	0,394	0,440	<b>0,515</b>	<b>0,704</b>	0,133	0,056	0,038	0,036	0,047	0,318	0,292	0,331	<b>0,667</b>	1					
NFO15	0,311	0,344	0,374	0,396	<b>0,525</b>	0,125	0,135	0,081	0,074	0,101	0,191	0,158	-0,180	<b>0,509</b>	<b>0,563</b>	1				
NFO30	<b>0,676</b>	<b>0,633</b>	<b>0,704</b>	<b>0,776</b>	<b>0,747</b>	0,381	0,240	0,284	0,278	0,261	<b>0,695</b>	<b>0,683</b>	0,338	<b>0,796</b>	<b>0,646</b>	0,461	1			
NFO45	0,456	<b>0,483</b>	<b>0,522</b>	<b>0,551</b>	<b>0,476</b>	0,253	0,153	0,190	0,178	0,170	<b>0,568</b>	<b>0,696</b>	0,402	<b>0,732</b>	0,429	0,318	<b>0,716</b>	1		
NFO60	0,401	0,435	0,458	<b>0,566</b>	<b>0,551</b>	0,230	0,110	0,088	0,117	0,086	<b>0,528</b>	<b>0,482</b>	0,335	<b>0,771</b>	<b>0,506</b>	0,287	<b>0,778</b>	<b>0,685</b>	1	
NFO90	0,419	<b>0,487</b>	<b>0,510</b>	<b>0,524</b>	<b>0,481</b>	0,304	0,217	0,257	0,253	0,212	<b>0,620</b>	<b>0,557</b>	0,306	<b>0,660</b>	0,225	0,360	<b>0,568</b>	<b>0,664</b>	<b>0,692</b>	1

Les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$

HT15j... : Hauteur total au 15, 30, 45, 60, 90 jours

Hhy15... : Hauteur de l'hypocotyle au 15, 30, 45, 60, 90 jours

NFE15... : Nombre de feuille au 15, 30, 45, 60, 90 jours

NFO15... : Nombre de folioles au 15, 30, 45, 60, 90 jours

#### Pour Ranomafana

Les matrices de corrélation ont montré que les deux caractères de croissance (HT, Hhyp) sont totalement liés avec des coefficients variant entre 0,751 à 0,993 qui sont hautement à très hautement significatifs. La croissance en hauteur et celle en hypocotyle sont linéairement dépendantes durant les trois premiers mois de développement des plantules en pépinière (cf tableau n°22). Cela est vérifié pour le cas de Bekorakaka.

Au niveau des caractères végétatifs (NFE, NFO), les coefficients de corrélation sont très faibles voir négatifs (-0,038) au début et deviennent significatifs à deux mois (0,747). Au troisième il est à 0,518. La liaison entre les deux caractères n'est pas donc trop forte pour le cas de Ranomafana.

Concernant la corrélation entre les caractères végétatif et croissance, la matrice de corrélation obtenue a montré la liaison entre ces deux caractéristiques sauf entre l'hauteur de l'hypocotyle et le nombre de folioles développées au 3<sup>ème</sup> mois. Mais ce dernier est expliqué par l'absence de la variabilité du caractère (Hhyp) au niveau des valeurs moyennes des plantules de Ranomafana durant les 3 mois de mesure (cf tableau 18). Le développement des différents caractères (HT, Hhyp, NFE et NFO) de la plantule est donc apparemment lié durant la phase de la croissance juvénile de l'espèce. Cela peut être expliqué avec l'importance du taux d'héritabilité génétique de ces caractères étudiés.

**Tableau n°22 :** Matrice de corrélation (Pearson) des caractères pour Ranomafana

Variable	HT15j	HT30j	HT45j	HT60j	HT90j	Hhy15	Hhy30	Hhy45	Hhy60	HHy90	NFE15	NFE30	NFE45	NFE60	NFE90	NFO15	NFO30	NFO45	NFO60	NFO90
HT15j	1																			
HT30j	<b>0,975</b>	1																		
HT45j	<b>0,942</b>	<b>0,978</b>	1																	
HT60j	<b>0,906</b>	<b>0,945</b>	<b>0,977</b>	1																
HT90j	<b>0,773</b>	<b>0,806</b>	<b>0,864</b>	<b>0,931</b>	1															
Hhy15	<b>0,925</b>	<b>0,921</b>	<b>0,877</b>	<b>0,865</b>	<b>0,768</b>	1														
Hhy30	<b>0,906</b>	<b>0,928</b>	<b>0,896</b>	<b>0,883</b>	<b>0,784</b>	<b>0,978</b>	1													
Hhy45	<b>0,893</b>	<b>0,926</b>	<b>0,906</b>	<b>0,896</b>	<b>0,806</b>	<b>0,969</b>	<b>0,993</b>	1												
Hhy60	<b>0,846</b>	<b>0,874</b>	<b>0,878</b>	<b>0,902</b>	<b>0,836</b>	<b>0,925</b>	<b>0,957</b>	<b>0,968</b>	1											
HHy90	<b>0,801</b>	<b>0,792</b>	<b>0,799</b>	<b>0,814</b>	<b>0,751</b>	<b>0,852</b>	<b>0,874</b>	<b>0,870</b>	<b>0,909</b>	1										
NFE15	<b>0,622</b>	<b>0,558</b>	<b>0,514</b>	0,401	0,231	0,425	0,392	0,341	0,298	0,269	1									
NFE30	<b>0,651</b>	<b>0,672</b>	<b>0,645</b>	<b>0,629</b>	<b>0,503</b>	<b>0,627</b>	<b>0,674</b>	<b>0,632</b>	<b>0,619</b>	<b>0,588</b>	<b>0,507</b>	1								
NFE45	<b>0,638</b>	<b>0,659</b>	<b>0,660</b>	<b>0,666</b>	<b>0,551</b>	<b>0,667</b>	<b>0,640</b>	<b>0,612</b>	<b>0,584</b>	<b>0,565</b>	0,402	<b>0,743</b>	1							
NFE60	<b>0,779</b>	<b>0,791</b>	<b>0,794</b>	<b>0,831</b>	<b>0,779</b>	<b>0,758</b>	<b>0,738</b>	<b>0,723</b>	<b>0,735</b>	<b>0,705</b>	0,465	<b>0,786</b>	<b>0,854</b>	1						
NFE90	<b>0,627</b>	<b>0,606</b>	<b>0,652</b>	<b>0,736</b>	<b>0,712</b>	<b>0,620</b>	<b>0,566</b>	<b>0,558</b>	<b>0,621</b>	<b>0,666</b>	0,257	<b>0,570</b>	<b>0,804</b>	<b>0,851</b>	1					
NFO15	0,329	0,349	0,305	0,336	0,266	<b>0,477</b>	<b>0,547</b>	<b>0,554</b>	<b>0,596</b>	<b>0,480</b>	-0,038	<b>0,596</b>	0,317	0,338	0,226	1				
NFO30	<b>0,743</b>	<b>0,774</b>	<b>0,760</b>	<b>0,773</b>	<b>0,744</b>	<b>0,748</b>	<b>0,750</b>	<b>0,738</b>	<b>0,731</b>	<b>0,668</b>	<b>0,497</b>	<b>0,720</b>	<b>0,767</b>	<b>0,899</b>	<b>0,678</b>	0,385	1			
NFO45	<b>0,711</b>	<b>0,731</b>	<b>0,674</b>	<b>0,725</b>	<b>0,702</b>	<b>0,701</b>	<b>0,690</b>	<b>0,682</b>	<b>0,655</b>	<b>0,536</b>	0,336	<b>0,655</b>	<b>0,708</b>	<b>0,807</b>	<b>0,658</b>	<b>0,473</b>	<b>0,846</b>	1		
NFO60	<b>0,736</b>	<b>0,731</b>	<b>0,648</b>	<b>0,673</b>	<b>0,610</b>	<b>0,765</b>	<b>0,758</b>	<b>0,749</b>	<b>0,729</b>	<b>0,636</b>	0,356	<b>0,622</b>	<b>0,649</b>	<b>0,747</b>	<b>0,551</b>	<b>0,607</b>	<b>0,790</b>	<b>0,921</b>	1	
NFO90	<b>0,612</b>	<b>0,591</b>	<b>0,546</b>	<b>0,569</b>	<b>0,523</b>	<b>0,490</b>	0,456	0,448	0,391	0,262	0,388	0,352	<b>0,569</b>	<b>0,576</b>	<b>0,518</b>	0,132	<b>0,556</b>	<b>0,819</b>	<b>0,738</b>	1

Les valeurs en gras sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$

### VIII.3.3- Mortalité au stade juvénile

Le taux de mortalité des plants après le repiquage et pendant le premier stade juvénile des plantules a été étudié dans cette partie. D'après les observations durant les cinq mesures, un léger taux de mortalité des plants a été remarqué après le repiquage.

**Tableau n°23 :** Taux de mortalité observé pour chaque provenance

		Mortalité							
		Période (Nombre des plants morts)							
Provenances	Nb plants testés	15j	30j	45j	60j	90j	Total	%	
Bekorakaka	BA1	20	5	0	0	0	0	5	25
	BA3	30	0	0	2	2	2	6	20
	BA4	30	0	1	1	0	1	3	10
	BA5	30	1	0	0	0	0	1	3
	BA6	30	0	0	0	1	2	3	10
	BA8	30	0	2	0	0	2	4	13
Total		170	6	3	3	3	7	22	13
Ranomafana	RF5	13	2	0	0	0	0	2	15
	RF10	29		0	0	0	2	2	7
	RF11	11	2	0	0	0	0	2	18
	RF12	17	2	0	0	0	1	3	18
	RF13	24		0	1	0	1	2	8
	RF15	26	1	0	1	0	0	2	4
Total		120	7	0	2	0	4	13	11
Moyenne									12,5
F									0,204
Pr>F									0,661 NS

Le taux de mortalité entre les deux provenances (Bekorakaka et Ranomafana) ne présente pas de différence significative. Cela est manifesté par la valeur atteignant 25% pour les individus de BA1. La qualité physiologique des graines produisant ces plantules de BA1 peut être parmi les explications de ce taux de mortalité. En effet, les résultats de cutting test ont donné un taux de 65% pour les graines de BA1. Les taux moyen de mortalité pour chaque provenance sont inférieurs à 15%. Entre les deux provenances, les valeurs moyennes obtenues n'ont pas présenté de différences significatives. Le taux de mortalité après 15 jours de repiquage ne dépasse pas les 10% pour les deux provenances. Ce taux atteint 13% à trois mois de développement des plantules en pépinière pour la provenance de Bekorakaka. La période de développement des plantules qui s'est situé pendant l'hiver (température variant de 12 à 23°C) peut expliquer ce taux de mortalité. Aussi, les plants repiqués sont issus de semis à partir de germination à des conditions contrôlées du laboratoire.

## **4<sup>ème</sup> partie : Discussions et recommandations**

### **Chapitre IX : Discussions**

#### **- Discussions méthodologiques**

Dans l'analyse de la diversité génétique à partir des marqueurs moléculaires, la combinaison des deux marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques ont donné beaucoup d'information sur la diversité et structure génétique des populations. L'étude effectuée sur *Dalbergia monticola* avec ces deux marqueurs a montré la complémentarité des résultats obtenus. Il s'agit par exemple des valeurs obtenus au niveau de l'indice de diversité ( $F_{st}$ ), l'hétérozygotie observée ( $H_o$  et  $H_{cp}$ ), le nombre d'allèles et chlorotypes ( $n_a$ ,  $n_{cp}$ ). Cette complémentarité est vérifiée aussi avec l'étude de Muller (2008) sur l'étude de diversité et flux de gène de *Pterocarpus officinalis* Jacq. La combinaison de ces deux marqueurs facilite également la compréhension de l'historique et l'événement récent d'une population. Elle donne aussi des informations sur le modèle attendu de flux de gène que les chloroplastes ont transmis par graines chez les angiospermes (Petit et al, 2005).

Concernant les résultats d'étude obtenu avec les marqueurs microsatellites nucléaires, élimination des 3 loci parmi les 8 utilisés, suspectés d'avoir des allèles nuls ont montré une légère diminution de la richesse allélique des population et diminue peu la valeur de l'index de fixation  $F_{is}$ . Ces résultats sont présentés en annexe (Annexe XI : article en cours de publication).

Lors de l'analyse des données sur la diversité génétique, le taux d'effectif de quelques sous populations a été étudié sous certaines réserves. Par exemple pour le nombre d'allèles moyens ( $N_a$ ), les populations sous représentées n'ont pas été généralement considérées dans les résultats.

Pour l'étude de la croissance juvénile des plants, la durée de 3 mois semble être restreinte pour statuer clairement sur l'héritabilité et la variabilité génotypiques des caractères.

#### **- Diversité génétique et facteurs historiques**

Autrefois, Madagascar faisait partie du super continent appelé Gondwana. L'Ile aurait commencé sa séparation de ce continent il y a environ 165 millions d'années et serait arrivé à sa position actuelle il y a 121 millions d'années (Rabinowitz et al. 1983). L'isolement de l'île depuis cette centaine de millions d'année ainsi que la diversité des régimes climatiques et des habitats sont à l'origine d'une combinaison du taux très élevé de la biodiversité ainsi que celui de l'endémisme. Selon Aide et Riviera (1998), un des facteurs qui a grandement influencé la structure et la répartition de la diversité génétique des espèces d'arbres dans son aire naturelle est la période de la dernière glaciation et la migration ultérieure de refuge.

Pour le cas de *Dalbergia monticola*, l'analyse de la diversité génétique au niveau des populations et sous populations étudiées a montré des valeurs d'hétérozygotie He variant de 0,51 à 0,82). Ces valeurs sont très importantes par rapport à certaines études effectuées sur des espèces provenant des pays insulaires et des pays continental (cf Annexe VIII). Dans le paragraphe suivant ces taux de diversité de *Dalbergia monticola* sont beaucoup comparés avec d'autres espèces angiospermes.

**- Impact de la fragmentation sur la diversité génétique du *Dalbergia monticola* dans son aire naturelle**

L'aire naturelle de *Dalbergia monticola* (forêt dense humide de moyenne altitude) est marquée par des fragmentations des forêts. Cela est dû aux défrichements incessants de la zone qui conduisent rapidement à la disparition de grandes superficies de forêts. Les peuplements fragmentés se présentent parfois peu denses sauf les aires protégées et les sous populations sont distantes de 0,5 à des dizaines de kilomètres.

Face à cette situation, **la diversité génétique globale de *Dalbergia monticola* est encore importante**. Par rapport aux résultats des autres études, les valeurs de diversité obtenues par population et sous population variant entre 0,60 à 0,82 sont élevées et correspondent aux résultats obtenus pour des espèces qui se trouvent dans des populations non encore exploitées : cas de *Swietenia macrophylla* (Lemes et al 2003, Novick et al 2003) originaire d'Amérique centrale, de *Grevillea macleayana* (England et al. 2002) de Queensland, *Caryocar brasiliense* de Brésil (Collevatti et al. 2003) qui sont toutes des espèces angiospermes et continentales.

Selon les résultats obtenus des marqueurs microsatellites nucléaires, la comparaison des paramètres de diversité entre les populations fragmentées et faiblement perturbées (code 1, 2 et 3 dans le tableau n°2) a montré qu'il n'y a de différence significative entre ces populations sauf le nombre d'allèles moyens ( $N_a$ ) (cf annexe IX). Mais ce dernier est beaucoup influencé par la taille des sous populations. Or dans cette comparaison, le nombre d'individus des populations fragmentées et peu perturbée n'est pas trop écarté (respectivement 265 et 211) et semble ne pas trop biaiser le test. L'absence de différence significative au niveau de l'hétérozygotie He peut être expliquée par les études menées par Lowe et al (2005) qui ont montré que le changement de diversité génétique après la fragmentation est observé quand la taille effective de la population est visiblement réduite et prend un nombre conséquent de générations. Dans leur étude, l'hétérozygotie diminue de 0,2 après 10 générations avec des populations isolées de 50 individus. Pour le cas de *Dalbergia monticola*, les activités humaines qui sont beaucoup marquées par les défrichements (tavy) conduisent rapidement à la réduction de l'aire naturelle de l'espèce et la fragmentation des forêts.

Malgré cela, l'effet de bottlenecks caractéristique des forêts fragmentées n'est pas encore marqué pour toutes les populations. **La fragmentation peut être donc trop récente (moins d'un siècle) pour déterminer ces effets de goulot démographique**. Ainsi, compte tenu de la longueur du



temps de renouvellement de la population de *Dalbergia monticola* (un ou deux siècles probablement), il est peu probable que l'on assiste à des phénomènes importants de dérive génétique pouvant fortement différencier les populations sur l'espace de temps d'un ou deux siècles.

Pour les marqueurs microsatellites chloroplastiques, la diversité génétique observée est également importante et la comparaison des valeurs de Hcp des populations fragmentées et non fragmentées ne présente pas de différence significative au niveau de ces deux types de populations (cf annexe VIII). Cela peut être expliqué par la faible taille d'échantillons étudiée de la population non perturbée par rapport à l'échantillon total.

L'isolement par la distance selon l'axe Nord Sud a été observé pour les populations de *Dalbergia monticola* d'après l'étude de gradient de diversité. Cela implique l'importance de la considération des quatre régions de provenances de l'espèce (Nord, Centre Nord, Centre et Sud) lors de la gestion des ressources génétiques de l'espèce. Cette remarque est valable pour la conservation *in-situ* et *ex-situ*.

Les résultats d'étude ont montré une différenciation moins structurée des populations de *Dalbergia monticola* dans son aire naturelle. Le mode de dispersion des graines à l'intérieur et entre populations peut expliquer cette structure avec le régime de reproduction connu de l'espèce à savoir «barochore». Cette faible différenciation peut être due aussi aux flux de pollen efficaces (entraînant des croisements des individus entre eux ou avec des individus proches apparentés) et l'isolement à cause de la distance des populations. La corrélation positive entre la distance génétique et la distance géographique affirme alors ce niveau de flux de pollen pour l'espèce.

Les résultats observés sur la construction des arbres phénétiques regroupent les populations suivant leur région de provenance. Sauf pour la population de Didy qui se situe dans la zone du Centre au lieu du Centre Nord. La particularité de cette population de Didy qui s'est placée dans la région du Nord a été déjà remarquée dans l'étude effectuée par marqueur RAPD lors d'une étude antérieure effectuée (Andrianoelina, 2002). Une particularité de flux de gène peut expliquer ce résultat pour Didy.

Globalement, **la structure génétique dans l'aire de distribution naturelle est caractérisée par la différence entre les populations du Nord et celles du Sud.** L'éloignement par distance de ces populations explique déjà cette différenciation. Cela pourrait résulter aussi d'un différent processus évolutionnaire historique séparé de zones refuges lesquelles ont été prises durant la dernière glaciation. Ce point a été signalé dans l'étude antérieure effectuée qui suggère la possibilité d'une zone refuge dans la région du Nord pour la forêt Didy (Andrianoelina et al. 2006).

**Les valeurs de  $F_{is}$  par populations et sous populations ont montré l'écart aux proportions d'Hardy-Weinberg au niveau du croisement de l'espèce.** Le flux de gène par pollen et le régime « barochorie » de l'espèce sont parmi les causes de cet écart. Il y a eu alors une faible dissémination des pollens et des graines à l'intérieur et entre les populations qui entraînent des croisements des individus de proche en proche (entre apparentés). Par conséquent les principes de la panmixie ne sont plus réalisés. Ainsi, l'autofécondation peut se produire au niveau des populations et entraînent cette structuration.

### **- Impacts de l'exploitation sur la dynamique de la diversité génétique**

L'étude plus localisée au niveau des populations de Bekorakaka et celles de Ranomafana permet de comparer la structuration de la diversité génétique entre une forêt exploitée et une forêt protégée.

En général, l'exploitation des espèces forestières par sélection des arbres conduit à la diminution de la densité des peuplements et des individus reproducteurs. Pour le cas de *Dalbergia monticola*, l'étude menée sur les différents paramètres génétiques a montré que l'exploitation les affecte différemment.

Au niveau de l'indice de fixation, pour Bekorakaka, le  $F_{is}$  est plus élevé par rapport à celui de Ranomafana avec des valeurs respectives de 0, 31 et 0.22. L'augmentation de la valeur de l'indice de fixation entre les populations exploitées et non exploitées peut être expliquée par les résultats de croisement entre apparentés et par une consanguinité élevée due à l'isolation des arbres adultes dans l'aire d'exploitation laquelle favorisa leur propre pollinisation. Cela mènera à l'abondance des régénérations issue de ce croisement.

Pour l'hétérozygotie attendue  $H_e$ , elle n'est pas affectée par la réduction de densité des arbres pour les cohortes jeunes et adultes. Ce résultat est cohérent avec celui de l'étude dans le cas où le flux de gène est efficace et où le nombre de génération après exploitation est petit (Lowe et al, 2005; Degen et al 2006).

Concernant les autres paramètres comme l'hétérozygotie observée et indice de richesse allélique, il n'y a pas de différence significative des valeurs au niveau des deux types de population (exploitée et protégée).

L'étude de coefficient d'apparentement des individus dans chaque sous population a donné de résultats plus significatifs pour Bekorakaka. La structure génétique spatiale de la population exploitée de Bekorakaka est donc mieux présentée par rapport à Ranomafana. Ces coefficients d'apparentement importants pour la population exploitée de Bekorakaka peuvent être expliqués par l'importance de

régénération des individus apparentés par effet de l'ouverture des forêts dû à l'exploitation qui facilite la régénération par dissémination des graines.

**- Variabilité adaptative au sein des populations naturelles des caractères liés à la physiologie de germination**

Au niveau des caractéristiques des graines, l'étude de leur dimension (longueur et largeur) permet de conclure que les graines de *Dalbergia monticola* présentent beaucoup de variabilité tant à l'intérieur (entre pieds d'individus semenciers) qu'entre les provenances. L'hétérogénéité des valeurs obtenues de ce caractère est généralement d'origine génétique.

La variabilité significative intra et inter provenance du poids des graines peut être traduite par la forte corrélation entre ce caractère et leur dimension. La différence des valeurs moyennes du poids entre les deux provenances peut être expliqué par l'abondance des graines de petite taille pour Ranomafana. Cela entraîne une différence significative inter provenance de la densité par kilos des graines de l'espèce. Du point de vue génétique, la forte d'héritabilité génétique obtenue au niveau des deux provenances indique que la variabilité de ce caractère est origine génétique.

Par rapport aux autres espèces de *Dalbergia* étudiées au niveau du SNGF, la densité moyenne de 49 500 graines/kg pour *Dalbergia monticola* est importante. En effet pour *Dalbergia greveana*, cette densité se situe autour de 41 000 graines/kg et celle du *Dalbergia emirnensis* est de 42 500. Pour *Dalbergia purpurecens*, *Dalbergia trichocarpa* et *Dalbergia mollis* (des espèces originaires de forêts sèches), leur densité de graines est largement inférieure à celle de *Dalbergia monticola* et qui ont des valeurs moyennes successives 35 000, 29 500 et 25 000 (Photo en annexe IX) des différentes formes des graines des 6 espèces de *Dalbergia*).

L'état de fermeture de la forêt peut être un des facteurs qui influence la variation de taille des graines à l'intérieur de chaque individu. Les deux types de forêts se différencient par le degré de couverture de la forêt dû au degré de l'exploitation (cf tableau n° 2). D'où l'abondance des graines de petite taille pour l'aire protégée de Ranomafana. Ainsi, les processus de fructification sont marqués par des multiplications de cellule (transformation de l'ovule fécondé en graine) qui ont besoin de lumière lors des différentes réactions en particulier la photosynthèse. Lors de la phase active de croissance des graines, les besoins en carbone (C) et azote (N) sont très importants et qui sont satisfaits au sein d'une gousse principalement par le flux phloémien et par la photosynthèse (Pate *et al.*, Peoples *et al.*, 1985).

Les résultats de cutting tests (par coupe de graines) ont permis d'identifier la meilleure qualité des graines issues de Bekorakaka. Cela était vérifié par les résultats obtenus sur le taux de germination moyen de 85% pour Bekorakaka contre 68% pour Ranomafana. Des valeurs intra provenance arrivent à 100% pour Bekorakaka. La corrélation positive entre le taux de germination et les pourcentages de

cutting test indique que pour *Dalbergia monticola* le taux de germination des graines est lié à la qualité anatomique des graines dont le pourcentage de cette dernière pourrait être observé à l'avance par cutting test.

Lors de la récolte et triage des graines, la mauvaise qualité de certaines graines de Ranomafana est généralement due à l'abondance d'attaque des chenilles ou des insectes depuis la phase de formation des fruits (gousses). Le degré de fermeture de la forêt et donc le degré d'exposition des arbres semenciers semblent être des facteurs qui entrent en jeu dans le développement et la maturation des graines. Pour le cas de Ranomafana, la forêt y est apparemment fermée. Le faible taux d'insolation ou éclaircissement pour certains arbres reproducteurs conduit parfois à une mauvaise formation de certaines graines et favorise l'attaque des chenilles.

L'étude de l'effet de la variabilité de la teneur en eau des graines après les récoltes n'a pas donnée de différence significative sur la germination entre les deux provenances. Il est à signaler que l'origine écologique de l'espèce (forêt humide) et la période de maturation des graines située en saison des pluies (janvier - mars) donne une teneur en eau élevée pour certains lots de graines. Mais par phénomène de dessèchement accéléré des graines, la teneur en eau arrive entre 6 à 8% après quelques jours de séchage (5 à 6 jours). Le dessèchement rapide des fruits sur l'arbre est aussi observé lors du passage brusque d'une longue période sèche entre la phase de fructification et de maturation des graines 2 à 3 semaines, ce qui entraîne une faible teneur en eau et une mauvaise formation de certaines graines.

L'étude physiologique sur l'effet de la température à la germination des graines de *Dalbergia monticola* indique que ce facteur est déterminant. Ce qui rejoint l'idée du rôle de la température dans la vitesse des réactions biochimiques des graines (Pesson, 1975). La température minimale de germination de l'espèce entre 10 à 15°C permet de dire que le semis des graines peut être effectué durant la période hivernale dans les zones ayant ces niveaux de température. Cette température minimale de germination pour *Dalbergia monticola* correspond à celle de beaucoup d'autres graines tropicales (Tompesett et Kemp 1997). Pour le cas de l'espèce *Azadiracta indica*, la température minimale de base de germination est de 11,8°C (Sacandé, 2000) et au dessous de ça les graines deviennent sensibles au froid.

Concernant la température optimale de germination, la gamme de 20 à 25°C est proche de celle du milieu écologique de provenance de l'espèce (Ranomafana de 14 à 27,4°C et Bekorakaka de 10 à 26°C). Ce qui a favorisé une bonne germination. Cet aspect rejoint les propos de Sento (1976) et Wood et Prichard (2003) selon lequel la performance de la germination à une gamme de température refléterait une adaptation à l'origine écologique de l'espèce.

L'étude du temps moyen de germination avec la température optimale de 20 à 25°C a permis d'avoir un taux de germination arrivant à 100% au bout de 5 à 6 jours en moyenne. Vu l'importance des valeurs obtenues sur le taux de germination de graines issues de Bekorakaka, l'état de fragmentation de la forêt et la forme de l'exploitation actuelle des arbres de *Dalbergia monticola* ne présentent pas encore des effets négatifs sur la capacité de germination. Ainsi, les résultats obtenus des différentes analyses sur les caractéristiques des graines (dimension, poids, anatomie, taux de germination) ont montré la performance des graines issues de Bekorakaka. L'isolement des arbres semenciers qui peut entraîner une certaine consanguinité semble donc pour le moment ne pas influencer la capacité de germination de leurs graines.

En général, la première levée (début de la germination) se produit dès le troisième jour après le semis pour l'espèce. Mais la diminution du niveau de températures rallonge ce délai. Par rapport aux autres espèces de *Dalbergia*, ce délai de première levée semble identique à ceux des résultats obtenus sur *Dalbergia greveana* et *Dalbergia trichocarpa* et *Dalbergia purpurens* à 30°C (température moyenne de la zone écologique de ces espèces). Pour d'autres espèces de Légumineuses, la levée a lieu au 4<sup>ème</sup> jour. Il s'agit par exemple de *Acacia mangium*, *Acacia dealbata*, *Sesbania sesban*, *Cajanus cajan*, *Sesbania macrantha*. (SNGF, 2004-2006)

Selon les résultats de taux germination par rapport à la teneur en eau des graines, la conservation des graines à des niveaux de teneur en eau situé entre 6 et 8%, est favorable pour *Dalbergia monticola*. Ainsi, les expériences sur les légumineuses au niveau du SNGF et certaines recherches sur la conservation, les graines de l'espèce sont conservables à cette condition. Il est à noter que l'essai après 10 mois de conservation des graines de *Dalbergia monticola* donne un taux moyen de germination de 80%.

#### **- Expression de la variabilité des caractères au stade de croissance juvénile en pépinière des descendants**

L'étude de la croissance juvénile en pépinière des plants de *Dalbergia monticola* pendant trois mois a permis de voir l'évolution des caractères de croissance (hauteur total et hauteur de l'hypocotyle) et le développement des caractères végétatifs (nombre des feuilles et nombre de folioles développées) pour l'espèce. Au niveau de la croissance, par rapport à certaines espèces autochtones de la forêt orientale élevées en pépinière (SNGF, 2004-2008), la croissance juvénile de *Dalbergia monticola* est moyennement lente avec une hauteur moyenne de 6 à 8 cm à l'âge de 3 mois. En effet pour *Eugenia jambolona* (Myrtacées) cette croissance est autour de 11 cm, près de 10,5 cm pour *Canarium madagascariensis* (Burseracées) et 8,5 cm pour *Phyllarthron madagascariensis* (Bignoniacées)

Parmi les caractères de croissance, la hauteur totale semble être très héritable durant la phase juvénile en pépinière. La corrélation du caractère hauteur totale des arbres mères et leurs descendants (plants) confirme cette héritabilité. Ainsi pour le cas de Bekorakaka, elle est liée à la morphologie des graines. Cela traduit la forte transmission de ce caractère de l'arbre mère aux descendants (graines puis plants) avec des valeurs d'héritabilité génétique autour de 0,9.

Les deux caractères de croissance sont fortement liés durant le stade de développement juvénile de *Dalbergia monticola*. A l'intérieur des provenances, la variabilité est très hautement significative pour la hauteur totale et moyennement significatif pour l'hypocotyle (voir non significatif pour le cas de Ranomafana). Cela peut être expliqué par la faible croissance de cette dernière. Par contre, l'effet provenance semble ne pas observer pour ces deux caractères durant la phase de croissance juvénile de l'espèce (pas de variation inter provenances significative).

Concernant les caractères végétatifs, le *Dalbergia monticola* présente depuis la phase juvénile une certaine variabilité intra et inter provenance des nombres de feuilles et de folioles développés. La corrélation entre les deux caractères n'est pas forte au stade juvénile. Du point de vue génétique, ils sont hérithables avec des valeurs de  $h^2A$  hautement significatives (autour de 0,8).

Pour *Dalbergia monticola*, les caractères de croissance et caractères végétatifs semblent être corrélés au début de la croissance juvénile sauf pour le caractère hauteur d'hypocotyle. L'accroissement de ce dernier qui est apparemment faible et diminue au cours du développement de la plantule peut expliquer cette observation. Les quatre caractères étudiés ne partagent pas la même héritabilité. La hauteur totale présente la plus haute valeur d'héritabilité génétique suivi des caractères végétatifs après.

Le taux de mortalité durant les phases juvéniles en pépinière ne dépassent pas les 15% pour l'espèce. Ce taux est apparemment moyen par rapport aux autres espèces autochtones élevées en pépinière (SNGF, 2004-2008). Par exemple pour *Khaya madagascariensis* (Méliacées), le taux se trouve entre 5 et 10%, *Canarium madagascariens* (Burseracées) près de 10%. Pour les espèces autochtones dans la forêt littorale du Sud Est de Madagascar, le taux de mortalité de la majeure partie des espèces autochtones testées est situé entre 5 et 10% (Randriatafika et al, 2007).

#### - **Vérification des hypothèses émises**

La première hypothèse indique que la structure de diversité génétique de *Dalbergia monticola* est déterminée par les événements historiques. Cela est vérifié selon les discussions menées sur l'historique d'évolution de l'île de Madagascar depuis sa séparation du continent Gondwana il y a 120 million d'année. Toute la structure et la richesse de la diversité ainsi que la forte endémicité des espèces est à l'origine de cet événement.

Face à l'hypothèse posée sur l'impact de la fragmentation de la forêt orientale sur la diversité génétique, les résultats obtenus n'ont pas montré l'accentuation de la dérive génétique sur les populations fragmentées. Les valeurs de richesse alléliques, le nombre de chlorotypes par sous population et l'hétérozygotie observée ne sont pas beaucoup différenciés entre les populations dégradées et peu perturbées. Ainsi les résultats d'étude sur l'effet d'étranglement démographique n'ont pas confirmé cette dérive génétique. Par suite de l'étude, l'hypothèse émise sur la réduction de la diversité au sein des populations dû à l'effet de la fragmentation et de l'exploitation n'est pas vérifié car les valeurs de diversité génétique obtenues sont encore important aussi bien entre les populations qu'à l'intérieur des sous populations.

Selon la troisième hypothèse, la capacité de reproduction des semenciers (germination de leurs semences) est influencée par la fragmentation et l'exploitation des forêts. Les résultats obtenus sur taux de germination des graines entre les deux provenances des forêts n'ont pas montré d'effet négatif sur cette capacité des graines à germer.

Les résultats obtenus sur l'étude des différents caractères relative à la recherche sur la physiologie de germination des graines et la croissance juvénile de *Dalbergia monticola* vérifie la quatrième l'hypothèse. Cette dernière indique que la germination et le développement des plantules sont sous influence génétique. Les taux d'héritabilité génétique obtenus au niveau de chaque paramètre étudié ont montré l'importance des valeurs génétiques dans l'expression de la variabilité au niveau des descendants (graines et plants).

## **Chapitre X : Recommandations**

Selon le Plan National Stratégique de Gestion des Ressources Phytogénétique Forestières à Madagascar et suite aux résultats de cette recherche, d'autres actions sont encore à entreprendre sur certains axes définis dans le Plan pour les espèces de *Dalbergia* en particulier *Dalbergia monticola*. Ce chapitre résume alors les activités déjà entreprises pour l'espèce selon les différents axes. Il apporte également les applications pratiques des résultats obtenus de cette recherche et propose certaines activités à entreprendre.

- Dans le cadre de l'exploration de la variabilité génétique de l'espèce qui définit le premier axe du PNGRPF, la localisation de l'aire de distribution naturelle de *Dalbergia monticola* a été déjà effectuée. Suite à cette présente étude, la connaissance de la diversité génétique à l'échelle globale et à l'échelle locale a été faite. Cette dernière indique qu'un potentiel important de diversité génétique de l'espèce est encore existant malgré la fragmentation de son habitat naturel et la forte exploitation du bois. Comme application dans la gestion des ressources, la sauvegarde par la conservation *in situ* et *ex situ* de cette variabilité résiduelle est importante. Cette gestion doit être donc considérée à travers les quatre zones de distribution de l'espèce pour assurer le maintien de cette diversité (Nord, Centre Nord, Centre et Sud). Au niveau local, pour procéder à une conservation *in-situ*, des mesures partagées avec les communautés locales sont alors indispensables.

- Selon le deuxième axe du Plan qui est basé sur l'étude biologique de l'espèce, des connaissances sur la botanique et la phénologie de *Dalbergia monticola* ont été établis. La taxonomie et certaines caractéristiques sylvoles de l'espèce ont été déjà élaborées par Bosser et Rabevohitra (1996) et par quelques études antérieures. Dans cette étude, la connaissance du mode de dissémination de pollen (entomophile) et de dissémination des graines (barochore) a permis d'interpréter les résultats l'analyse de la diversité génétique par marqueurs moléculaires. Malgré cela, un renforcement des connaissances sur l'écologie de reproduction serait nécessaire pour connaître la capacité de régénération naturelle de l'espèce (cycle de reproduction, production graminée, régénération naturelle etc)

- Pour le troisième axe du PNGRPF, qui est basé sur la recherche ethnobotanique et socio-économique, des études socio-économiques sur la filière *Dalbergia* (y compris le *Dalbergia monticola*) de la zone orientale ont été déjà menées par quelques étudiants. Le mode d'exploitation qui mène à la disparition de certaines ressources génétiques est déjà connu. Par contre la potentialité des ressources résiduelles face aux besoins n'est pas encore estimée. D'où l'importance des travaux d'inventaire pour avoir des idées sur la gestion future (surface ou nombre de pieds exploitable, diamètre minimale d'exploitabilité etc)

- Dans le quatrième axe définissant les mesures de gestion durable des espèces, des applications des résultats de cette étude sont menées. Comme indiqué dans l'axe 1, la conservation *in*



et ex situ est importante pour la sauvegarde de la diversité génétique résiduelle. Dans le cadre de la gestion in situ, la participation des populations locales est recommandé pour assurer la mise en place d'un programme établi. Cela demande une certaine sensibilisation en leur faisant connaître la situation des ressources en particulier le *Dalbergia*. Ainsi, une certaine formation en matière de gestion des ressources forestières est nécessaire pour eux (préservation, enrichissement, restauration et exploitation). Concernant la conservation *ex-situ*, les deux formes de banque de gène (banque de graines et parcelles conservatoires) sont préconisées. Cela pourrait s'effectuer par le renforcement de capacité de gestion de banque de graines au niveau du SNGF en augmentant la collecte des graines de l'espèce et en développant la recherche sur la technologie de conservation à long terme des semences. Pour la mise en place des parcelles conservatoire de la diversité génétique de *Dalbergia monticola*, l'installation multilocale peut permettre de connaître l'adaptation de l'espèce.

- Concernant l'axe 5 du Plan qui parle de la multiplication et la domestication de l'espèce, les résultats de cette étude ont donné une certaine application sur la multiplication de l'espèce par graine et l'état de développement des plantules au stade juvénile. Cela indique la facilité de la production des plants par graines au vu de la réussite de la germination et l'homogénéité de croissance des plantules en pépinière. La vulgarisation des techniques simples et adaptables pour la production de plants et la plantation de *Dalbergia monticola* aux différents acteurs et les collectivités locales est donc favorable. Cela peut être appuyé par une certaine activité comme la mise en place des parcelles de démonstration de plantation et de soins sylvicoles, l'élaboration des fiches techniques de vulgarisation de plantation et la formation des populations locales aux techniques de reforestation, d'enrichissement et de plantation de l'espèce.

- L'axe 6 du Plan national a mis les mesures de valorisation de l'espèce. Pour *Dalbergia monticola*, l'utilisation en tant que bois d'œuvre a déjà mis l'espèce à une certaine. Mais vu les produits résiduels d'exploitation abandonnés dans la forêt, une certaine valorisation de ces derniers est importante. Il s'agit par exemple de la transformation en des petits produits d'art ou de décoration de petite taille. Pour le moment, selon les résultats de notre recherche, l'exploitation du bois de *Dalbergia monticola* ne remet pas en cause sa variabilité génétique. Par ailleurs, le prélèvement raisonné des arbres favorise la régénération des peuplements avec une certaine diversité. Mais il faut prendre des précautions pour ne pas détruire l'écosystème de l'espèce en gardant un nombre conséquent d'individus semenciers dans les parcelles à exploiter. Cela permet de réduire le risque de disparition totale de certains gènes. La valorisation des produits secondaire d'exploitation peut être considéré pour *Dalbergia monticola*, par exemple l'usage comme petits produits d'art ou décoration.

## Conclusion

La réduction continue de la superficie des forêts constitue une grande menace pour la biodiversité malgache. Cela est dû à différentes formes d'exploitation. Ces dernières diminuent la densité des populations d'arbres et conduit à la fragmentation des forêts qui peuvent entraîner à la réduction de la diversité génétique des ressources. Pour le cas de la forêt orientale, le défrichement et la culture sur brûlis constituent la principale cause de la disparition des superficies forestières.

Face à cette menace, l'étude menée sur *Dalbergia monticola*, une des essences très exploitées de la forêt dense humide de l'Est, a fourni des connaissances sur la diversité génétique à différentes échelles, la physiologie de germination et la première phase d'adaptation des plants en milieu *ex situ*. Par la suite, les résultats ont été utilisés pour voir les liaisons entre ces trois éléments étudiés dans le cadre de la gestion des ressources phytogénétiques forestières de l'espèce en question.

L'utilisation de marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques dans cette recherche, complémentaire avec l'étude antérieure effectuée sur la diversité globale de *Dalbergia monticola* réalisée par le marquage moléculaire RAPD, a fourni davantage des informations sur la structure de la diversité génétique à échelle régionale, au niveau des populations et sous populations. Cela a permis de mesurer différents paramètres de diversité génétique, de connaître les flux de gènes et de déterminer les coefficients d'apparentement entre les individus des sous populations.

Les valeurs obtenues sur l'étude de la diversité génétique indiquent que cette dernière semble importante dans la zone de distribution de l'espèce. Elles correspondent encore à des valeurs de diversité génétique observées dans des populations non encore exploitées. Par contre la structure de cette diversité génétique est apparemment faible dans l'ensemble de l'aire naturelle due généralement au régime de reproduction de l'espèce « barochorie – anthomophilie ». Ce phénomène se traduit par une faible dissémination des graines qui mène à de forts taux d'individus apparentés très rapprochés. Ainsi, les flux de gène sont aussi très réduits.

A l'échelle locale, l'étude des deux types de forêts (exploitée et protégée) a montré que le coefficient d'apparentement est important dans la zone exploitée de Bekorakaka par rapport à la zone protégée de Ranomafana. Il s'agit de la conséquence de l'abondance des individus apparentés suite à l'ouverture des forêts ce qui facilite la régénération par dissémination des graines à Bekorakaka.

Malgré la fragmentation de la forêt de la région orientale due aux interventions humaines, l'effet de goulot démographique caractéristique des forêts fragmentées n'est pas encore marqué pour les populations de *Dalbergia monticola*. Cependant, des mesures adéquates seraient indispensables pour éviter l'aggravation de l'impact de cette fragmentation sur la dynamique de l'évolution de la diversité génétique de l'espèce en question.

Au niveau de la physiologie de germination des graines, le taux de germination reflète une variabilité génétique intra et inter provenances des graines. Il atteint jusqu'à 100% à une température optimale située entre 20 et 25%. Ainsi la température minimale se trouvant entre 10 et 15°C indique la possibilité de semis durant la période hivernale pour l'espèce.

Pour *Dalbergia monticola*, le caractère hauteur totale au stade juvénile est fortement héritable. Il présente une liaison forte avec le développement de la hauteur de l'hypocotyle. La croissance des plants est généralement homogène durant ce stade de développement (jusqu'à l'âge de trois mois en pépinière).

Dans le cadre de gestion des ressources génétiques de l'espèce, la sauvegarde du potentiel de diversité résiduelle est importante face à la forte dégradation de la forêt orientale. Cela peut être faite par la conservation *in situ* et *ex situ* de la variabilité résiduelle. Cette gestion doit être donc considérée à travers les quatre zones de distribution de l'espèce pour assurer le maintien de cette diversité (Nord, Centre Nord, Centre et Sud).

Pour la conservation *ex situ*, les deux formes de banque de gène (banque de graines) et parcelles conservatoires sont préconisées. Ainsi, la multiplication et la vulgarisation de la plantation de l'espèce sont favorables au vu de la réussite de la germination des graines et du développement adéquat des plants en pépinière (homogénéité de la croissance juvénile).

Pour le moment, l'exploitation du bois de *Dalbergia monticola* ne remet pas en cause sa variabilité génétique. Par ailleurs, le prélèvement raisonné des arbres favorise la régénération des peuplements avec une certaine diversité. Mais il faut prendre des précautions pour ne pas détruire l'écosystème de l'espèce en gardant un nombre conséquent d'individus semenciers dans les parcelles à exploiter. Cela permet de réduire le risque de disparition totale de certains gènes.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aide T.M. and Rivera E., 1998 ; Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia amata* (Moraceae) : implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. *J. ; Biogeogr* ; 25 ; 695–705.
- Andrianoelina A.O., 2002 ; Elaboration d'éléments de base de gestion d'une espèce de palissandre à Madagascar ; Mémoire de DEA ; Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo
- Andrianoelina A.O., Rakotondraoelina H., Ramamonjisoa L., Maley B., Danthu P., Bouvet J.-M., 2006; Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity Conservation* ; 15 ; 1109-1128.
- Arnold U. et Andrianaiivo A.O., 2000 ; Gestion des ressources phytogénétiques forestières : études axées sur *Dalbergia baronii*, *Dalbergia greveana*, *Dalbergia monticola* et *Dalbergia perrieri* ; Rapport de stage 2000 ; 102 p
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F., 1996-2004 ; GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II ; Montpellier ; France
- Boisset M., 2007 ; Diversité génétique de l'espèce forestière en milieu fragmenté à Madagascar ; Rapport de stage ; Cirad Département Systèmes Biologiques ; UPR39
- Bosser J. et Rabevohitra, 1996 ; Synopsis des légumineuses de Madagascar ; Laboratoire de Phanérogamie ; Muséum ; Paris France et DRFP/FOFIFA Tananarive ; Madagascar.
- Bosser J. et Rabevohitra, 1996 ; Taxa et noms nouveaux dans le genre *Dalbergia* à Madagascar – *Bull. Mus. Hist.* ; Paris ; 4<sup>e</sup> série ; 18 ; 1996 ; section B ; n°3-4 ; p : 171-212.
- Bousquet J., Simon L., Lalonde M., 1990 ; DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction ; *Canadian Journal of Forest Research* ; 20 ; 254-257
- Bryan G.J., McNicoll J., Ramsay G., Meyer R.C., De Jong W.S., 1999 ; Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of solanaceous plants ; *Theor Appl Genet* ; 99 ; 859–867
- Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F., 1967 ; Phylogenetic analysis ; models and estimation procedures ; *Evolution* ; 32 ; 550-570
- Caughley G. & Gunn, A., 1996 ; *Conservation Biology in Theory and Practice*. Blackwell Science, Inc. 459 pp.
- Charbonnier B., 1998 ; Limites et dynamique coutumière dans la forêt classée d'Ambohilero ; à l'intérieur de la cuvette de Didy ; S.E d'Ambatondrazaka ; Mémoire ; Mastère en Foresterie Rurale Tropicale ; ENGREF – CIRAD – Forêt ; p 90.
- Cloutier D., Kanashiro M., Ciampi A.Y., Schoen D.J., 2007 ; Impacts of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. *Molecular Ecology* ; 16 ; 797–809.
- Collevatti R.G., Grattapaglia D., Hay J.D., 2003 ; Evidence for multiple lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequence and microsatellite haplotype variation ; *Molecular Ecology* ; 12 ; 105-115.
- Cornuet J.M. & Luikart G., 1996 ; Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data ; *Genetics* ; 144 ; 2001-2014
- Dayanandan S., Dole J., Bawa K., Kesseli R., 1999 ; Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree ; *Carapa guianensis* (Meliaceae) ; *Molecular Ecology* ; 8 ; 1585–1592.

- DEF, 2002 ; Bases de données ; Service Valorisation et Suivi Evaluation Direction des Eaux et Forêts – MEF
- Degen B., L. Blanc, H. Caron, L. Maggia, A. Kremer, S. Gourlet-Fleury, 2006 ; Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species Biological Conservation ; 131 ; 386–401
- Douglas T.B., Suarez A.V., Crooks K.R., Morrison S.A. & Case T.J., 2000 ; Arthropods in urban habitat fragments in southern California: area, age and edge effect. Ecol. App.10(4): 1230-1248
- Du Puy D., 1998 ; *Dalbergia monticola* ; In: IUCN 2006 ; 2006 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
- England P.R., Usher A.V., Whelan R.J., Ayre D.J., 2002 ; Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. Mol Ecol ; 11 ; 967-977
- Escoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M., 1992 ; Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes, application to human mitochondrial DNA restriction data ; Genetics ; 131 ; 479-491
- ESSA, 1996 ; Cours d'inventaire forestier ; 4ème année ; Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques ; Université d'Antananarivo.
- Favreau B., Andrianoelina A.O., Nunez P., Vaillant A., Ramamonjisoa L., Danthu P. and Bouvet J.-M., 2007 ; Characterization of microsatellite markers in the rosewood (*Dalbergia monticola* Bosser & R. Rabev.) ; Molecular Ecology Notes ; 7 ; 774-776
- Felsenstein J., 1993 ; PHYLIP : Phylogenetic inference package ; Version 3.66. University of Washington ; Seattle ; WA
- Glaubitz J.C., Murrell J.C., Moram G.F., 2003 ; Effects of native forest regeneration practices on genetic diversity in *Eucalyptus consideniana* ; Theor. Appl. Genet ; 107 ; 422–431
- Goudet J., 2001 ; Fstat ; a program to estimate and test gene diversity and fixation indice (version 2.9.3.2) ; updated from Goudet J., 2005 ; A computer program to calculate F-statistiques ; Journal of Heredity ; 86 ; 485-486
- Grivet L., Noyer J.L., 1999 ; Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire ; in : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées ; Montpellier : Cirad 1999 ; pp 13-41
- Guillot G., Mortier F., Gosson J.-F. & Estoup A., 2005 ; A spatial statistical model for landscape genetics ; Genetics ; 170 ; 1261-1280
- Guillaumet J.L., 1984 ; The Vegetation : An Extraordinary diversity ; In: Jolly A., Oberlé P., & Albignac E.R (Eds) ; Key environments, Madagascar. Pergamon Press ; Oxford: 27-54
- Hardy, O. J. & X. Vekemans, 2002 ; SPAGeDi ; a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels ; Molecular Ecology ; Notes 2 ; 618-620.
- Humbert H., 1965 ; Description des types de végétation, in Humbert H. Coursdargne G.; Notice de la carte Madagascar; Trav. Sect. Sc. Tech. Inst. Fr. Pondichery, h;s n°6; pp 46-78
- Hurlbert S.H., 1971 ; The non-concept of species diversity ; a critique and alternative parameters ; *Ecology* 52 , 577-586.
- Jennings S.B., Brown N.D., Boshier D.H., Whitmore T.C., Lopes, J.C.A., 2001 ; Ecology provides a pragmatic solution to the maintenance of genetic diversity in sustainable managed tropical rain forests ; For. Ecol. Manage ; 154 ; 1–10.
- Kettle C.J., Hollingsworth M., Jaffre T., Moran B. and Ennos R.A., 2007 ; Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer ;

*Araucaria nemorosa* Laubenfils ; *Molecular Ecology* ; 16 ; 3581-3591

- Kameswara Rao N et al, 2006 ; Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes ; Manuels pour les banques de gènes No. 8 ; Bioversity International
- Kanashiro M., Thompson, I.S. et al, 2002 ; Improving conservation values of managed forest: the Dendrogene Project in the ; Brazilian Amazon ; *Unasylva* ; 209 ; 26–33.
- Koechlin J., 1974 ; Flore et végétation de Madagascar ; J Cramer ; In der Gantner Verlag Kommanditgesellschaft ; FL 9490 ; Vaduz
- Lemes M.R., Gribel R., Proctor J., Grattapaglia D., 2003 ; Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon based on variation at microsatellite loci : implications for conservation ; *Mol Ecol* 12 ; 2845-2883
- Lourmas M., 2005 ; Impact de l'exploitation forestière sur la Démographie et la Dynamique de la Diversité Génétique ; cas *Entadrophragma cylindricum* Sprague ; Thèse de doctorat en Génétique de population-Université de Montpellier II ; 80 p.
- Lowe A.J., Bosier D., Ward M., Bacles C.F.E. and Navarro, 2005 ; Genetic resource impacts of habitat loss and degradation ; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees ; *Heredity* 95 ; 255-273.
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G. & Taberlet P., 2003 ; Landscape genetics : combining landscape ecology and population genetics ; *Trends in Ecology and Evolution* ; 18 ; 189-197.
- Marivana B.S., Kanashiro M., Yamaguishi C.A., Thompson I., Magno S.A., 2008 ; Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon ; *Forest Ecology and Management*; 255 ; 1548–1558
- Marques S.J., 1986-2006 ; *Systema Naturae 2000* ; Services taxonomiques universels Amsterdam, Pays Bas
- MEF/SNGF, 2000 ; Plan National Stratégique de Gestion des Ressources Phytogénétiques Forestières – MEF/ SNGF / MINEV/ ONE/ MRS/ FOFIFA ; p 23.
- Minenv, 2002 ; Stratégie National de la Gestion Durable de la Biodiversité ; Ministère de l'Environnement
- Moat J., Smith P., 2007 ; Atlas of the vegetation of Madagascar ; Kew Publishing ; Royal Botanic Garden
- Mousadik El A. & Petit R.J., 1996 ; High lvel of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco ; *Theor Appl Genet* ; 92 ; 832-839
- Muller F., Voccia A., Bâ A., Bouvet J.M., 2008 ; Genetic diversity and gene flow in Caribbean tree *Pterocarpus officinalis* Jcq : a study based on chloroplast and nuclear microsatellites ; *Genetica* ; DOI 10.1007/s10709-008-9268-4
- Nason, J.D., Hamrickm, J.L., 1997 ; Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation : two case studies of neotropical canopy trees ; *J. Heredity* ; 88 ; 264–276.
- Ndoyé K., 2001 ; La gestion des ressources génétiques au Sénégal : application au complexe d'espèce *Acacia nilotica* ; Thèse de l'Université de Cheikh Anta Diop
- Nei M., 1978 ; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals ; *Genetics* ; 89 ; 583-590
- Nei M., 1987 ; *Molecular evolutionary genetics* Columbia University Press ; New York, NY ; USA.
- Newton A.C., Allnut T.R., Gillies A.C.M., Lowe A.J. & Ennos R.A., 1999 ; Molecular geography ; intraspecific variation and the conservation of tree species ; *Trends in Ecology*

and Evolution ; 14 ; 140-145

- Noss, R.F. & Csuti, B., 1997 ; Habitat Fragmentation. In: Principles of Conservation Biology ; 2nd ed. Meffe, G.K. & Carroll, C.R. Sinauer Associates, Inc.
- Novick R.R., Dick C.D., Lemes M.R., Navarro C., Caccon A., Bermingham E., 2003 ; Genetic structure of Mesoamerican population of big-leaf mahogany ; *Swietenia macrophylla* ; inferred from microsatellite analysis ; *Mol Ecol* ; 12 ; 2885-2893
- Oldfield S., 1988 ; Rare tropical timbers ; IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK ; p.48
- Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., Nijs J.C.M., 2003 ; Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation ; *Biological Conservation* ; 113 ; 389-398.
- Page R.D.M., 1996 ; TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences*, 12, 357-358
- Pate et al, 1977 ; In : *Agrophysiologie du pois protéagineux*, par Nathalie Munier et al, 2005 ; Arvalis Institut, p 113 (books.google.fr)
- Peoples et al, 1985 ; In : *Agrophysiologie du pois protéagineux*, par Nathalie Munier et al, 2005 ; Arvalis Institut, p 113 (books.google.fr)
- Pereboom V., 2006 ; Mode d'utilisation du milieu fragmenté par une espèce forestière aux habitudes discrètes, la martre des pins *martes martes* ; Thèse de doctorat ; Université d'Angers ; Spécialité Biologie et Organisme
- Perrier X., Flori, A., Bonnot F., 2003 ; Data analysis methods ; In : Hamon P., Seguin M., Perrier X. , Glaszmann J.C. Ed. ; *Genetic diversity of cultivated tropical plants* ; Enfield ; Science Publishers ; Montpellier ; pp 43 - 76.
- Pesson P., 1975 ; La germination des semences ; Formation permanente en écologie et biologie ; Institut National Agronomique ; Gauthier-villard ; ISBN 2-04-004495-7 ; Bordas 1975
- Petit R.J., Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Salvini D., Vendramin G.G., 2005 ; Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14 ; 689-701
- Pimm S.L., Jones H.L. and Diamond J., 1988 ; On the risk of extinction ; *Am. Nat.* 132 ; 757-785
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.-M. et al, 1999 ; BOTTLENECK : a computer program for detecting recent reductions in effective population size from allele frequency data ; *Journal of Heredity* ; 90 ; 502-503
- Pritchard J.K., Falush D. & Wen X., 2007 ; Documentation for structure software : Version 2.2 ; disponible sur <http://pritch.bsd.uchicago.edu>
- Rabinowitz P.D., Coffin M.F. et Falvey B., 1983 ; The separation of Madagascar and Africa. *Science* ; 220 : 67-69.
- Randriatafika F. et al, 2007 ; in *Biodiversity, Ecology and Conservation of littoral Ecosystems in Southeastern Madagascar* ; Tolagnaro (Fort Dauphin)
- Rajora O.P., Rahman M.H., Buchert G.P., Dancik B.P., 2000 ; Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario ; Canada ; *Molecular Ecology* ; 9 ; 339-348
- Rasolomampianina R., Bailly X., Fetiarison R., Rabevohitra R., Bena G., Ramaroson L., Raherimandimby M., Moulin L., De LaJudie P., Dreyfus B. & Avarre J.-C., 2005 ; Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) ; endemic to Madagascar host seven different genera belonging to  $\alpha$  and  $\beta$ -Proteobacteria ; *Molecular Ecology* ; 14 ; 4135-

- Raymond M., and Rousset F., 1995; An exact test for population differentiation; *Evolution*; 49 ;1280-1283
- Rija A., Caroline I.B. *et al*, 2001 ; Etude de la filière *Dalbergia* (palissandre) à Madagascar ; Tome I : étude socio-économique de la filière - Rapport de stage 2001 ; p 73
- Ritland K., 1996 ; A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations ; *Evolution* 50 ; 1062-1073
- Rousset F., 1996 ; Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance ; *Genetics* ; 145 ; 1219-1228
- Sacandé M., 2000 ; stress ; Storage and Survival of Neem Seed ; Thèse de doctorat ; Université de Wageningen ; 120 pp
- Saitou N., Nei M., 1987 ; The neighbor-joining method ; a new method for reconstructing phylogenetic trees ; *Molecular Biology and Evolution* ; 4 ; 406-425
- Saunders D.A., Hobbs R.J., Margules C.R., 1996 ; Biological consequences of ecosystem fragmentation ; *Conservation Biology* ; 5 ; 18-32.
- Sento T., 1976 ; Studies on the germination of Palms seeds ; University of Ehime ; Japan ; 3-70 pp
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L., 2000 ; Arlequin version 2000 : a software for population genetics data analysis ; Genetics and Biometrics Laboratory ; Department of Anthropology ; University of Geneva, Geneva, Switzerland
- SNGF, 2004-2006 ; Base de données du laboratoire, Section Apprêt et Qualité des Graines, Laboratoire ; Ambatobe Antananarivo
- SNGF, 2004-2008 ; Base de données des pépinières, Section pépinière, Ambatobe Antananarivo
- Tompesett et Kemp, 1997 ; Database of tropical tree seed research, with special reference to *Dipterocarpaceae*, *Meliaceae* and *Araucariaceae* ; Database content and User Manual ; Royal Botanical Gardens ; Kew ; UK..
- Washitani I., Ishihama F., Matsumura C. et al., 2005 ; Conservation ecology of *Primula sieboldii*: synthesis of information toward the prediction of the genetic/demographic fate of a population ; *Plant Species Biology* ; 20 ; 3–15.
- Whitmore T.C. and Sayer J.A., 1992 ; Tropical Déforestation and Species Extinction ; London/ New York, Chapman & Hall
- Weir B.S., Cockerham C.C., 1984 ; Estimating F-statistics for the analysis of population structure; *Evolution* 38: 1358–1370.
- Weising K. & Gardner R.C., 1999 ; A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisme in chloroplast genome of dicotyledons angiosperms ; *Genome* ; 42; 9-19
- Wright S.J., 1931 ; Evolution in Mendelian populations ; *Genetics* ; 16 ; 97 - 159
- Wright S.J., 1943 ; Isolation by distance ; *Genetics* ; 28 ; 114 - 138
- Wood, C.B. and Prichard, H.W., 2003 ; Germination characteristics of fresh and dried *Hyophorbe lagenicaulis* seeds ; *Palms* ; 47 ; 45-50



### **Références internet :**

Mediaterre 2006 : <http://www.mediaterre.org/madagascar/gen.php3>

Planète vivante, 2008 : <http://planetevivante.wordpress.com/2008/04/11biodiversité-malgache>

<http://www.tela-botanica.org/eflora/2006.01/nt/1155/synthese>

IUCN <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/38259/all>

PAE, 1991 <http://www.sommetjohannesburg.org/initiatives/gouvernance-cas2.html>

XLSTAT, 2008 : <http://www.xlstat.com>

ANNEXE I : Caractéristiques des individus échantillonnés										
Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)		Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)
Nord	Tsaramolotra	Ts1	1.50	25,0		Centre Nord	Madiorano	Md1	15.0	30,0
		Ts2	0.50	<2,0				Md2	8.0	15,0
		Ts3	10.00	30,0				Md3	14.0	24,0
		Ts4	8.00	14,0				Md4	16.0	20,0
		Ts5	10.00	14,0			Ankeniheny	Ak1	10.0	14,0
		Ts6	6.00	16,0				Ak2	14.0	19,0
		Ts7	10.00	35,0				Ak5	8.0	11,0
		Ts8	12.00	18,0				Ak6	9.0	14,0
		Ts11	6.00	12,0			Sandranjahana	SD1	2.0	3,2
		Ts12	5.00	3,0				SD2	5.0	6,7
	Ampitsongonana	Ap1	7.00	8,0				SD3	8.0	10,2
		Ap2	15.00	28,0				SD4	7.0	6,7
		Ap3	1.00	<2,0				SD5	10.0	16,2
		Ap4	4.00	5,0				SD6	11.0	14,6
		Ap5	2.00	2,0				SD7	9.0	9,9
		Ap6	7.00	16,0				SD8	5.0	3,5
		Ts9	1.00	<2,0				SD9		9,2
		Ts10	1.00	<2,0				SD10	12.0	15,3
Centre Nord	Didy	Dd1	16.00	45,0				SD11	7.0	12,7
		Dd2	2.00	5,0				SD12	12.0	13,4
		Dd3	8.00	18,0				SD13	11.0	16,6
		Dd4	10.00	23,0				SD14	8.0	8,6
		Dd6	4.00					SD15	10.0	17,8
		Dd7	9.00	18,0				SD16	5.0	7,0
		Dd8	13.00	20,0				SD17	6.0	10,2
		Dd10	14.00	26,0				SD18	6.0	8,9
		Dd13	10.00	16,0				SD19	7.0	7,0
		Dd14	13.00	35,0				SD20	15.0	18,5
		Dd15	9.00	16,0				SD21	4.0	3,5
		Dd16	3.00	5,0				SD22	15.0	21,3
		Dd17	10.00	18,0				SD23	8.0	8,9
	Valivaona	V1	16.00	66,9				SD24	14.0	14,6
		V2	13.00	22,9				SD25	14.0	14,6
		V3	7.00	12,1				SD26	10.0	10,8
		V4	12.00	21,7				SD27	9.0	11,1
		V5	12.00	20,7				SD28	15.0	13,4
		V6	16.00	48,4				SD29	13.0	17,2
		V7	14.00	19,4				SD30	5.0	3,8
		V8	10.00	13,7				SD31	9.0	7,0
		V9	13.00	23,2				SD32	5.0	5,4
		V10	8.00	13,4				SD33	10.0	18,2
		V11	15.00	23,6				SD34	13.0	17,5
		V12	16.00	24,8				SD35	14.0	17,8
		V13	15.00	21,3				SD36	10.0	15,6
		V14	14.00	17,5				SD37	15.0	18,2
		V15	13.00	13,7				SD38	14.0	21,3
		V16	18.00	79,6				SD39		7,0
		V17	13.00	15,6				SD40	11.0	11,5
		V18		29,3				SD41	5.0	5,1
		V19	7.00	13,4				SD42	14.0	20,1
		V20	6.00	13,1				SD43	8.0	8,6
	Ambohijanahana	Ab1	7.00	16,0				SD44	5.0	5,1
		Ab2	5.00	7,0				SD45	12.0	12,7
		Ab3	20.00	70,0				SD46	7.0	5,7
		Ab4	6.00	16,0				SD47		11,8
		Ab5	6.00	14,0				SD48	11.0	16,2
		Ab6	7.00	7,0				SD49	10.0	11,1
		Ab8	8.00	18,0				SD50	12.0	19,7
		Ab10	22.00	60,0				SD51	7.0	14,6
		Ab11	10.00	20,0				SD52	11.0	10,5
	Antsevabe	At2	15.00	28,0				SD53	6.0	8,3
		At3	15.00	34,0				SD54	12.0	14,3
		At4	14.00	24,0				SD55	4.0	2,5
		At5	7.00	14,0				SD56	10.0	16,2

		At6	3.00	6,0				SD57	6.0	5,4
		At7	2.00	3,0				SD58	5.0	6,4
		At8	10.00	14,0				SD59	6.0	5,4
		At9	6.00	14,0				SD60	6.0	6,7
		At10	7.00	16,0				SD61	10.0	9,2
		At11	5.00	8,0				SD62	5.0	7,6
Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)		Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)
	Sahambaky	SA1	10.0	8,3				Bk18	5.0	3,8
		SA2	8.0	8,3				Bk19	7.0	3,8
		SA3	15.0	11,1				Bk20	14.0	13,1
		SA4	21.0	25,8				Bk21	6.0	3,8
		SA5	11.0	8,9				Bk22	6.0	4,5
		SA6	11.0	9,9				Bk23	5.0	5,4
		SA7	10.0	11,5				Bk24	14.0	19,1
		SA8	7.0	4,1				Bk25	10.0	10,2
		SA9	19.0	18,5				Bk26	10.0	7,3
		SA10	16.0	15,3				Bk27	6.0	7,0
		SA11	13.0	12,4				Bk28	11.0	13,4
		SA12	6.0	5,7				Bk29	6.0	8,3
		SA13	5.0	3,5				Bk30	6.0	8,6
		SA14	6.0	5,4				Bk31	16.0	16,9
		SA15	5.0	14,3				Bk32	4.0	3,8
		SA16	10.0	14,0				Bk33	4.0	2,5
		SA17	15.0	16,9				Bk34	3.0	13,4
		SA18	4.0	4,1				Bk35	3.0	3,8
		SA19	10.0	11,5				Bk36	4.0	4,8
		SA20	9.0	8,9				Bk37	12.0	11,8
		SA21	8.0	10,5				Bk38	14.0	14,6
		SA22	20.0	22,3				Bk39	5.0	3,8
		SA23	9.0	11,5				Bk40	2.5	1,9
		SA24	8.0	11,8				Bk41	9.0	11,4
		SA25	5.0	3,5				Bk42	8.0	8,6
		SA26	11.0	11,8				Bk43	13.0	13,7
		SA27	14.0	14,3				Bk44	13.0	14,0
		SA28	9.0	6,7				Bk45	17.0	22,3
		SA29	6.0	4,8				Bk46	7.0	7,0
		SA30	14.0	15,0				Bk47	6.0	9,2
		SA31	11.0	14,6				Bk48	6.0	7,0
		SA32	8.0	5,4				Bk49	7.0	8,6
		SA33	9.0	9,2				Bk50	7.0	10,2
		SA34	10.0	9,9				Bk51	15.0	14,6
		SA35	5.0	4,1				Bk52	5.0	6,7
		SA36	11.0	12,1				Bk53	8.0	11,5
		SA37	9.0	7,0				Bk54		15,9
		SA38	10.0	11,1				Bk55	14.0	13,7
		SA39	5.0	13,7				Bk56	5.0	8,3
		SA40	14.0	14,4				Bk57	6.0	4,8
		SA41	11.0	6,7				Bk58	4.0	4,5
		SA42	8.0	4,1				Bk59	7.0	9,6
		SA43	12.0	11,1				Bk60	9.0	9,6
		SA44	11.0	8,0		Manasame na		B(m)1	12.0	7,0
		SA45	12.0	8,0				B(m)2	8.0	18,0
		SA46	14.0	12,1				B(m)3	6.0	10,0
		SA47	11.0	9,6				B(m)4	3.0	5,0
		SA48	14.0	13,4				B(m)5	10.0	22,0
		SA49	18.0	15,6				B(m)6	15.0	26,0
		SA50	6.0	8,6				B(m)7	9.0	20,0
		SA51	15.0	14,6				B(m)8	9.0	20,0
		SA52	13.0	14,3				B(m)10	8.0	21,0
		SA53	7.0	5,4		Analamazaotra		A1	6.0	13,4
		SA54	16.0	15,9				A2	9.0	27,4
		SA55	15.0	16,9				A3	14.0	15,3
		SA56	12.0	12,7				A4	11.0	12,7
		SA57	6.0	9,2				A5	18.0	36,3
		SA58	4.0	3,5				A6	15.0	35,7
	Bekorakaka	Bk1	11.0	10,8				A7	14.0	23,2

		Bk2	7.0	12,1				A8	22.0	63,7
		Bk3	5.0	6,4				A9	8.0	26,8
		Bk4	10.0	10,5				A11	13.0	27,1
		Bk5	8.0	10,2				A12	16.0	29,9
		Bk6	4.0	3,5				A13	17.0	54,8
		Bk7	10.0	12,7				A14	16.0	20,7
		Bk8	2.5	3,2				A17	12.0	17,5
		Bk9	5.0	6,7				A18	10.0	18,2
		Bk10	11.0	12,4				A19	6.0	9,9
		Bk11	13.0	22,6				A20	12.0	17,2
		Bk12	15.0	17,5				A21	12.0	10.0
		Bk13	7.0	9,9				A22	7.0	15,9
		Bk14	11.0	12,1				A23	7.0	12,7
		Bk15	5.0	3,2				A24	8.0	17,5
		Bk16	3.0	2,5				A25	12.0	23,9
		Bk17	6.0	5,4				A29	3.0	0,0
Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)		Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)
	Mantadia	M1	14.0	22,9				Rf47	18.0	25,8
		M2	20.0	29,6				Rf48	11.0	7,0
		M3	14.0	19,4				Rf49	15.0	20,4
		M4	13.0	22,3				Rf50	10.0	8,3
		M5	15.6	38,2				Rf51	9.0	10,8
		M6	11.0	13,4				Rf52	6.0	6,1
		M7	11.0	14,6				Rf53	10.0	13,1
		M8	16.0	21,0				Rf54	8.0	10,5
		M9	3.5	8,3				Rf55	16.0	23,6
	Mahatazana	R1	11.0	22,0				Rf56	12.0	24,2
		R2	6.0	8,0				Rf57	15.0	29,6
		R3	16.0	25,0				Rf58	8.0	12,1
		R4	6.0	5,0				Rf59	10.0	27,4
		R5	4.0	4,0				Rf60	12.0	7,6
		R6	18.0	17,0				Rf61	18.0	25,8
		R7	6.0	8,0				Rf62	9.0	16,2
		R8	11.0	15,0				Rf63	9.0	10,2
		R9	13.0	26,0				Rf64	13.0	20,4
		R13	5.0	5,0				Rf65	15.0	28,7
		R14	6.0	6,0				Rf66	14.0	29,0
		R15	7.0	14,0				Rf67	18.0	34,7
		R16	6.0	12,0				Rf68	13.0	10,8
		R17	8.0	7,0				Rf69	9.0	15,9
		R18	3.0	4,0				Rf70	11.0	16,2
		R19	10.0	25,0				Rf71	5.0	6,7
		R22	4.0	10,0				Rf72	12.0	19,1
		R23	1.2	5,0				Rf73	11.0	17,5
		R24	14.0	16,0				Rf74	6.0	11,5
Sud	R-Talatakely	Rf1	14.0	23,9				Rf75	10.0	10,5
		Rf2	11.0	15,9				Rf76	18.0	34,7
		Rf3	13.0	29,3				Rf77	16.0	22,6
		Rf4	12.0	21,0				Rf78	13.0	25,5
		Rf5	16.0	27,4				Rf79	7.0	9,2
		Rf6	14.0	22,3				Rf80	6.0	10,2
		Rf7	15.0	24,2				Rf81	4.0	5,7
		Rf8	19.0	31,5				Rf82	10.0	9,6
		Rf9	16.0	26,4				Rf83	15.0	20,4
		Rf10	13.0	41,4				Rf84	18.0	22,6
		Rf11	11.0	28,0				Rf85	13.0	16,2
		Rf12	10.0	31,2				Rf86	19.0	30,9
		Rf13	9.0	24,5				Rf87	5.0	6,7
		Rf14	4.0	6,7				Rf88	15.0	19,4
		Rf15	12.0	16,6				Rf89	17.0	15,9
		Rf16	15.0	27,7				Rf90	10.0	10,2
		Rf17	21.0	23,6				Rf91	8.0	11,8
		Rf18	13.0	14,0				Rf92	18.0	25,5
		Rf19	14.0	66,2				Rf93	9.0	13,4
		Rf20	8.0	16,6				Rf94	8.0	10,5
		Rf21	8.0	28,7				Rf95	5.0	9,2
		Rf22	10.0	23,2				Rf96	11.0	12,7
		Rf23	6.0	19,7				Rf97	13.0	17,8
		Rf24	10.0	30,3				Rf98	14.0	16,2
		Rf25	18.0	67,8				Rf99	8.0	13,4
		Rf26	13.0	30,3				Rf100	5.0	5,7

		Rf27	6.0	6,1				Rf101	11.0	2,9
		Rf28	5.0	3,8				Rf102	4.0	3,2
		Rf29	7.0	9,6				Rf103	13.0	15,3
		Rf30	7.0	8,3				Rf104	15.0	18,2
		Rf31	4.0	4,8				Rf105	7.0	6,1
		Rf32	13.0	13,7				Rf106	18.0	29,3
		Rf33	10.0	16,2				Rf107	14.0	15,6
		Rf34	14.0	16,2				Rf108	3.0	2,5
		Rf35	13.0	13,1				Rf109	5.0	7,3
		Rf36	6.0	8,9				Rf110	11.0	16,2
		Rf37	17.0	26,8				Rf111	10.0	13,1
		Rf38	10.0	9,9				Rf112	16.0	30,6
		Rf39	5.0	5,1				Rf113	5.0	4,1
		Rf40	5.0	6,4				Rf114	12.0	11,1
		Rf41	13.0	14,3				Rf115	14.0	16,9
		Rf42	7.0	9,9				Rf116	15.0	13,4
		Rf43	14.0	9,2				Rf117	6.0	6,7
		Rf44	12.0	14,3				Rf118	12.0	13,7
		Rf45	19.0	22,3				Rf119	14.0	17,5
		Rf46	3.0	4,5				Rf120	6.0	4,8
								Rf121	7.0	7,3
Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)		Régions	Sous pop°	Echantillons	Hauteur (m)	Diamètre (cm)
		Rf122	8.0	9,6			Tolongoina	T1	1.0	<2,0
		Rf123	24.0	37,6				T2	2.0	<2,0
		Rf124	7.0	16,2				T4	9.0	13,0
		Rf125	18.0	27,7				T5	6.0	9,0
		Rf126	12.0	17,5				T6	2.0	3,0
		Rf127	8.0	6,7				T7	6.0	8,0
		Rf128	5.0	4,1				T8	4.0	8,0
		Rf129	13.0	14,3				T9	2.0	<2,0
		Rf130	15.0	22,0				T10	3.0	3,0
		Rf131	9.0	9,6				T11	4.0	12,0
	R-Vatolampy	Rv132	11.0	24,5				T12	3.0	5,0
		Rv133	11.0	19,4				T13	8.0	14,0
		Rv134	14.0	19,4				T14	5.0	8,0
		Rv135	13.0	17,5				T15	8.0	20,0
		Rv136	5.0	5,4				T16	20.0	70,0
		Rv137	16.0	24,2				T17	4.0	5,0
		Rv138	12.0	14,0				T19	7.0	10,0
		Rv139	12.0	16,6				T20	3.0	3,0
		Rv140	15.0	26,4						
		Rv141	10.0	10,2						
		Rv142	10.0	11,1						
		Rv143	9.0	9,2						
		Rv144	4.0	5,1						
		Rv145	13.0	20,7						
		Rv146	9.0	9,2						
		Rv147	14.0	17,8						
		Rv148	14.0	20,7						
		Rv149	11.0	13,7						
		Rv150	12.0	14,6						
		Rv151	14.0	17,5						
		Rv152	14.0	17,2						
		Rv153	15.0	16,9						
		Rv154	15.0	21,0						
		Rv155	14.0	23,9						
		Rv156	14.0	20,7						
		Rv157	8.0	7,3						
		Rv158	16.0	22,0						
		Rv159	7.0	14,0						
		Rv160	9.0	14,0						
		Rv161	10.0	16,2						
		Rv162	11.0	15,9						
		Rv163	9.0	14,6						
		Rv164	8.0	12,4						
		Rv165	8.0	13,7						
		Rv166	14.0	14,0						
		Rv167	16.0	18,5						
		Rv168	20.0	24,8						
		Rv169	12.0	15,6						

		Rv170	13.0	14,0						
		Rv171	17.0	29,9						
		Rv172	14.0	20,4						
		Rv173	15.0	22,0						
		Rv174	9.0	17,8						
		Rv175	10.0	18,8						
		Rv176	14.0	24,5						
		Rv177	16.0	22,0						
		Rv178	15.0	15,9						
		Rv179	17.0	24,8						
		Rv180	6.0	6,4						
		Rv181	15.0	19,7						
		Rv182	20.0	27,1						
		Rv183	19.0	25,5						
		Rv184	9.0	10,8						
		Rv185	17.0	21,7						
		Rv186	20.0	34,7						
		Rv187	20.0	31,5						
		Rv188	18.0	25,8						
		Rv189	16.0	22,0						
		Rv190	16.0	28,0						
		Rv191	20.0	26,8						
		Rv192	7.0	11,8						
		Rv193	8.0	17,8						
		Rv194	6.0	6,7						

## **ANNEXE II**: Technique d'extraction d'ADN

Méthode de J. BOUSQUET et al. 1990

### PROTOCOLE DE BASE

#### **1. Préparation du tampon**

- Mettre le bain-marie à 65°C ;
- Sortir le tampon d'extraction de la chambre froide et le mettre à réchauffer ;
- Rajouter du sulfite de Na pour une concentration finale de 0,5 ;
- Agiter la préparation et placer au bain-marie.

#### **2. Extraction**

- Peser 60mg de feuilles séchées (choisir les parties les plus vertes) ;
- Couper les feuilles en petites morceaux (à la main) et les mettre dans des mortiers (optionnel : ajouter une pointe de spatule de sable de fontainebleau si les échantillons sont coriaces) ;
- Ajouter de l'azote liquide et broyer en fine poudre ;
- Quand l'azote est évaporé, ajouter 1,5ml de tampon d'extraction ;
- Ajouter une pointe de spatule de polyvidone, puis mélanger ;
- Transférer dans un microtube de 2ml ;
- Laisser incubé 30min sous agitation à 65°C (bain-marie) ;
- Récupérer les tubes et ajouter 700µl de chloroforme/alcool isoamylique ;
- Remuer 5min par agitation douce (inversion des tubes à la main) ;
- Centrifuger 15min à 15300rpm à t°C ambiante ;
- Récupérer la phase supérieure à la micropipette (P1000) et la transvaser dans un microtube 1,5ml (éventuellement recentrifuger quelques min si des saletés ont été prélevées et retransvaser) ;
- Ajouter 1/10 du volume récupéré d'acétate de sodium ;
- Compléter le tube avec l'isopropanol glacé ;
- Mélanger doucement par retournements (optionnel : laisser au congélateur – 20°C ou – 80°C) ;
- Centrifuger 15min à 6000rpm ;
- Éliminer le surnageant en versant ;
- Rincer le culot par 700µl d'éthanol (70%) par aspirations-refoulements ;
- Sécher au speedvac environ 5–10min (selon la taille des culots), t°C médium ;
- Reprendre le culot par 80µl d'eau, doucement par quelques aspirations-refoulements si il ne se dissout pas, laisser au bain-marie à 65°C au moins ½ heure (selon le degré de sécheresse du culot). On peut également laisser les tubes à t°C ambiante la nuit ;
- Conserver la solution ainsi réalisée à 4°C (quelques jours) ou à – 20°C (si plus longtemps) en attendant le dosage.

**ANNEXE III** : Caractéristique des arbres  
semenciers

**Site** : Ambodigoavy

**Lieu** : Analatsara - Ambodigoavy

N° ARBRE	LATITUDE (S)	LONGITUD E(E)	HAUTEUR (m)	DIAMETRE (cm)
BA1	19°07'05,5"	48°23'35"E	12	27.1
BA2	19°07'29"	48°24'00,8"	8	28.7
BA3	19°03'39,0"	48°20'22,9"	15	26.8
BA4	19°03'41,3"	48°20'27,6"	15	24.8
BA5	19°03'55,9"	48°20'25,6"	18	27.4
BA6	19°03'52,9"	48°19'24,6"	14	19.7
BA8	19°05'51,0"	48°18'26,3"	13	18.5

**Site** : Sahamalaotra

**Lieu** : Ranomafana

N° ARBRE	LATITUDE	LONGITUD E	HAUTEUR	DIAMETRE
RF1	21°13'52,8"	47°24'10,0"	17	19.1
RF2	21°13'50,8"	47°24'14,0"	19	30.3
RF5	21°13'33,9"	47°24'15,2"	24	33.4
RF6	21°13'33,9"	47°24'15,2"	19	28.0
RF8	21°13'34,0"	47°24'13,4"	19	23.9
RF10	21°13'35,4"	47°24'14,8"	19	21.7
RF11	21°13'38,8"S	47°24'15,6	21	31.2
RF12	21°13'24,1"	47°24'19,9"	16	21.7
RF13	21°13'22,6"	47°24'22,4"	18	28.7
RF14	21°13'21,6"	47°24'22,0"	24	30.3
RF15	21°13'21,0"	47°24'23,1"	22	27.6



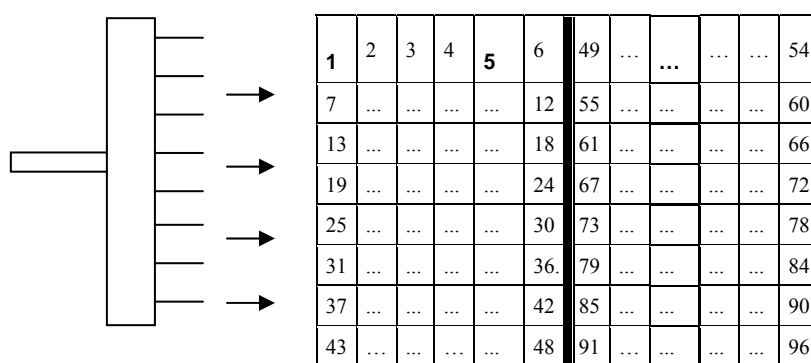
## ANNEXE IV : Protocoles et conditions de manipulation du séquenceur

### 1. Conditions de migration au séquenceur LICOR IR2

- Multiplexage :  
2µL des produits PCR marqués à 700nm  
+ 3µL des produits PCR marqués à 800nm  
+ 15µL du Mix contenant le bleu de formamide et les desmilings voulus
- Préparation du gel : gel à 6.5% : 20 ml Juvéniles/bisacrylamide + 25 µl de Temed +175 µl d'APS 10%
- Remplir la cuve supérieure et inférieure du séquenceur avec du TBE 1X
- Lancer la prémigration : d'une durée de 45 min, elle sert à chauffer le gel et à aligner les lasers et la caméra qui coulisent sur un axe

<b>Collect time = 2h30</b>	<b>Voltage</b>	1500	<b>Gain 800</b>	5	<b>Noise</b>	1
<b>Prerun time=45 min</b>	<b>mA</b>	35	<b>Gain 700</b>	5	<b>Noise</b>	1
	<b>W</b>	40	<b>Collect time</b>	2.30		
	<b>T°</b>	48	<b>Prerun time</b>	45		

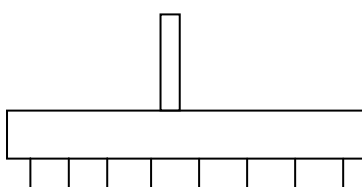
- Préparer le mix de desmiling en mélangeant les marqueurs dans un tube à hémolyse:  
1 tube de marqueur inférieur à 700  
+1 tube de marqueur inférieur à 800  
+1 tube de marqueur supérieur à 700  
+1 tube de marqueur supérieur à 800  
+3 ml de bleu de charge
- Rajouter les marqueurs dans chaque puit de la plaque PCR multiplexée
- Dénaturation 3 minutes à 94°C, avec deux puits avec 4µL de lader et protéger la plaque de la lumière du dépôt.
- Transfert du ladder et des échantillons sur la règle de dépôt :
  - Déposer 2 µl de **ladder dénaturé** (small size de 367 à 71 pb ou large size de 718 à 71 pb) dans le 1er et le dernier puit de la règle
  - Prélever 2 µl de la 1<sup>ère</sup> colonne (1 à 29) avec une multipette selon le schéma ci-dessous Le prélèvement des échantillons se fait en colonne et le dépôt dans la règle se fait en ligne



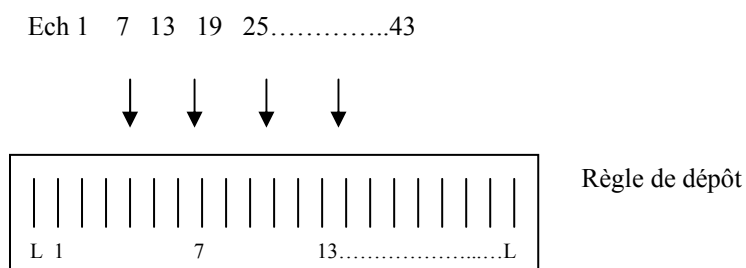
multipette

Plaque PCR multiplexée

- Transférer les échantillons sur la règle de dépôt à partir du 2<sup>ème</sup> puit, le 1<sup>er</sup> puit étant chargé en Ladder (L). La multipette permet de déposer 1 échantillon tous les 6 puits



multipette



- 
- 
- Prélever la colonne suivante et déposer dans la règle de dépôt en décalant le positionnement de la multipette de 1 puit
- Faire de même pour les colonnes suivantes
- Quand tous les échantillons ont été déposés, charger le dernier puit avec 2 µl de Ladder
- Le dépôt est réalisé avec 1 peigne en papier jetable. Celui-ci peut être utilisé environ 3 fois mais doit être lavé, rincé et séché avant chaque utilisation
  - Positionner le peigne parallèlement à la règle de dépôt, la bande blanche face à soi et les dents du peigne incurvées vers l'extérieur
  - Aligner les dents du peigne face aux puits correspondants de la règle
  - Glisser le peigne vers les puits jusqu'à ce que les dents rentrent dans les interstices des puits et le placer verticalement pour que les dents rentrent en contact avec les échantillons
  - Soulever le peigne verticalement
  - Placer les dents du peigne plaquées contre la paroi intérieure du séquenceur, et le faire glisser doucement vers le gel en vérifiant que toutes les dents soient verticales
  - Mettre le fond miroir derrière le gel
  - Pousser légèrement jusqu'à ce que les dents rentrent en contact avec le gel
  - Fermer le capot du licor, cliquer sur le bouton « collect image » pour lancer la migration, attendre 10 sec et stopper la migration en ouvrant le capot
  - Enlever le peigne
  - Prélever du tampon de migration avec une seringue et rincer le puit 1 fois en injectant le tampon le long du puit
  - Placer la cuve supérieure de migration
  - Refermer le capot pour démarrer la migration
  - 
  - Pour visualiser le gel pendant la migration, cliquer sur « current image », « refresh », « 700 » ou « 800 », « sensitivity »
  - Pour arrêter le gel avant les 2h30, cliquer sur « collect image » puis « done collecting »

<b>ANNEXE V</b> : Modèle des résultats brutes de l'analyse de variance sur XLSTAT-Pro						
		(Hauteur total à 45j)				
XLSTAT 7.5 - ANOVA - le 28/09/2008 à 18:22:57						
Variable(s) dépendante(s) : classeur = croissancefinalRAfBekensemble2.xls / feuille = Feuil4 /						
		plage = \$F\$2:\$F\$19 / 18 lignes et 1 colonne				
Pondération uniforme (par défaut)						
Variables qualitatives : classeur = croissancefinalRAfBekensemble2.xls / feuille = Feuil4 /						
		plage = \$B\$2:\$B\$19 / 18 lignes et 1 colonne				
Aucune donnée manquante détectée						
Contraintes : a1 = 0						
Type I SS, III SS						
Effectuer des tests de comparaisons multiples						
Intervalle de confiance (%) : 95,00						
Modélisation de la variable H3 :						
Résumé pour la variable dépendante :						
Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
H3	18	18	0	18	46.819	6.174
Résumé pour les variables qualitatives :						
Variable	Nombre de modalités	Modalités	Fréquences			
Bloc	6	1 ~ 2 ~ 3 ~ 4 ~ 5 ~ 6	3 ~ 3 ~ 3 ~ 3 ~ 3 ~ 3			
Coefficients d'ajustement :						
R (coefficient de corrélation )	0.963					
R² (coefficient de détermination)	0.927					
R²aj. (coefficient de détermination ajusté)	0.897					
SCR	47.212					
Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables (H0 = Y=Moy(Y)) :						
Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F	
Modèle	5	600.829	120.166	30.543	< 0,0001	
Résidus	12	47.212	3.934			
Total	17	648.041				
Analyse du modèle (Type I SS) :						

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F		
Bloc	5	600.829	120.166	30.543	< 0,0001		
Analyse du modèle (Type III SS) :							
Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F		
Bloc	5	600.829	120.166	30.543	< 0,0001		

**ANNEXE VI :** Protocole d'essai sur la caractérisation des graines, la germination et la croissance juvénile des plants

**PROTOCOLE D'ESSAI**

**1- Caractérisation des graines**

A appliquer pour chaque échantillon (lot d'individu)

**a- Etude de caractéristiques des graines :**

- Mesure de dimension (longueur et largeur) des graines avec un matériel bien calibré (10 graines par échantillon).
- Mesure du poids frais des graines : 10 graines X 2

**b- Mesure de la teneur en eau :**

- Par principe, deux mesures de teneur en eau (avant et après séchage des graines)

Séchage à effectuer avec l'humidimètre : 1 gramme de poids frais pour l'appareil

$$TE = (\text{Poids sec} / \text{poids frais}) * 100$$

**c- Mesure de l'équilibre d'humidité relative**

Mesure d'eHR à effectuer avec 60 graines pendant 1h30 à 20°C avec l'appareil de mesure d'eHR Rotronic.

**2- Test de germination**

Utilisation de 40 graines en faisant un dispositif de 10 graines \* 4

Au labo :

- Essai à 7 niveau de température : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C (incubateur sans lumière), 25 °C avec lumière (chambre de germination)
- Essai à effectuer dans des boîtes de germination transparentes
- Substrat : gel d'agar à 1% ou papier buvard

Pour les résultats de germination :

- Suivi chaque 2 jours du nombre des graines germées
- La germination est notée quand la radicule pousse de 2 mm.
- Le temps moyen de germination est obtenu par la formule :

$$MTG = \frac{\sum D_n}{\sum n}$$

Avec n nombre de graines germées à un temps D, D nombre de jour depuis le début du test de germination

- Durée de test : 20 j

### **3- Etude de croissance des plantules**

#### **a- Repiquage des plantules**

- Repiquage des plantules (ayant 3 cm de hauteur) issus des graines testées au laboratoire
- Support : pot plastique de couleur noire 13 cm X 25 cm
- Substrat : 1/3 terre + 1/3 terre noire + 1/ sable
- Arrosage chaque jour
- Ombrage permanent pendant 15 jours, quelques heures par jour après

#### **b- Suivi de croissance**

- Caractères suivis : caractère de croissance (hauteur totale et hauteur d'hypocotyle) et caractère végétatif (nombre de feuilles et nombre de folioles développées)
- Fréquence : tous les 15 jours
- Durée de mesure : 3 mois

#### **c- Mensuration et comptage**

##### Mensuration

- Hauteur total : à partir du collet jusqu'à la bourgeon terminale
- Hauteur de l'hypocotyle : du collet jusqu'à l'emplacement des cotylédons

##### Comptage

- Nombre des feuilles : comptage d nombre de feuilles développées (cumulé)
- Nombre de folioles : comptage du nombre de folioles sur la dernière feuille développée

## **ANNEXE VII** : Résultats par provenance d'analyse de variance et héritabilité des caractères

### **Provenance de Bekorakaka**

#### **Hauteur totale**

Individus	Ht 15j	Ht 30j	Ht 45j	Ht 60j	Ht 90j
BA1	33,611 b	38,333 b	44,111 b	48,056 b	60,556 c
BA3	33,967 b	37,333 b	43,407 b	48,463 b	59,011 c
BA4	34,900 b	38,933 b	45,200 b	51,400 b	68,274 b
BA5	42,000 a	47,633 a	55,400 a	63,000 a	80,833 a
BA6	42,467 a	48,267 a	53,633 a	59,600 a	69,867 b
BA8	29,000 c	34,011 c	39,163 c	44,689 c	57,079 c
Moyenne	36,00	40,75	46,81	52,53	65,93
F	15,89	18,83	30,54	14,21	14,72
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,000	0,0001
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,937 ***	0,946 ***	0,967 ***	0,929 ***	0,932 ***
CVp (%)	14,7	14,2	13,1	13,9	13,7

#### **Hauteur de l'hypocotyle**

Individus	Hyp 15j	Hyp 30j	Hyp 45j	Hyp 60j	Hyp 90j
BA1	21,722 b	24,167 b	26,167 b	28,444 b	29,167 a
BA3	19,933 b	20,867 b	24,089 b	25,744 b	26,822 a
BA4	20,033 b	21,400 b	23,500 b	25,167 b	26,452 a
BA5	23,500 a	24,967 b	27,367 b	29,133 b	29,633 a
BA6	26,233 a	28,067 a	30,067 a	32,067 a	32,433 a
BA8	18,433 b	19,581 b	21,733 c	23,130 c	23,586 b
Moyenne	21,64	23,17	25,48	27,28	28,01
F	7,75	6,632	8,24	9,89	6,83
Pr > F	0,002	0,004	0,001	0,001	0,003
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,871	0,849	0,876	0,898	0,853
CVp (%)	14,10	14,88	12,55	12,34	11,94

#### **Nombre des feuilles développées**

Individus	NFE 15j	NFE 30j	NFE 45j	NFE 60j	NFE 90j
BA1	2,000 b	2,500 b	3,444 a	4,222 b	4,167b
BA3	2,033 b	2,667 b	4,348 a	4,244 b	5,159 a
BA4	2,000 b	2,567 b	3,500 a	4,933 b	6,352 a
BA5	2,467 a	3,167 a	4,233 a	5,700 a	6,200 a
BA6	2,467 a	3,367 a	4,500 a	5,367 b	5,333 a
BA8	2,000 a	2,459 b	3,493 a	4,615 b	4,868 a
Moyenne	2,16	2,78	3,92	4,84	5,34
F	25,28	6,01	1,78	5,83	4,56
Pr > F	0,0001	0,005	0,191	0,006	0,015
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,960	0,833	0,438	0,828	0,780
CVp (%)	10,78	15,26	18,00	13,86	17,88

## Nombre de folioles développées

Individus	NFO 15j	NFO 30j	NFO 45j	NFO 60j	NFO 90j
BA1	6,667 b	6,833 b	8,444 b	9,667 b	11,278 b
BA3	6,433 b	7,433 b	9,367 a	10,589 b	11,732 b
BA4	7,400 a	7,667 b	9,367 a	11,067 b	12,048 b
BA5	7,033 b	8,133 a	9,800 a	12,233 a	14,300 a
BA6	7,000 b	7,833 b	10,067 a	11,967 a	14,067 a
BA8	6,667 b	7,330 b	9,367 a	11,800 a	13,378 b
Moyenne	6,86	7,53	9,42	11,22	12,80
F	6,65	6,91	5,57	5,95	5,54
Pr > F	0,003	0,003	0,007	0,005	0,007
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,849	0,855	0,820	0,831	0,819
CVp (%)	5,55	6,49	6,58	9,67	11,25

## Provenance de Ranomafana

### .Hauteur totale

Individus	Ht 15j	Ht 30j	Ht 45j	Ht 60j	Ht 90j
RF5	42,444 a	49,889 a	57,111 a	63,222 a	81,667 a
RF10	32,800 b	38,789 b	41,526 b	46,815 b	58,989 b
RF11	35,222 b	43,000 b	49,000 b	56,667 b	75,222 b
RF12	36,133 b	43,133 b	46,667 b	55,200 b	70,333 b
RF13	29,958 b	35,417 b	37,167 b	42,250 b	51,917 b
RF15	42,458 a	49,750 a	53,042 a	59,042 a	73,875 b
Moyenne	36,50	43,33	47,41	53,86	68,66
F	5,01	5,39	5,87	6,03	4,33
Pr > F	0,010	0,008	0,006	0,005	0,017
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,800	0,814	0,829	0,834	0,769
CVp (%)	15,90	15,08	17,22	16,19	18,93

### Hauteur d'hypocotyle

Individus	Hyp 15j	Hyp 30j	Hyp 45j	Hyp 60j	Hyp 90j
RF5	22,222 a	23,667 a	24,556 a	25,778 a	28,444 a
RF10	17,870 a	19,893 a	20,063 a	20,889 a	24,670 a
RF11	20,000 a	22,111 a	22,889 a	25,000 a	26,000 a
RF12	21,400 a	22,867 a	23,333 a	25,267 a	28,200 a
RF13	17,542 a	19,208 a	19,958 a	21,250 a	22,625 a
RF15	23,333 a	24,833 a	25,417 a	26,583 a	27,917 a
Moyenne	20,39	22,09	22,70	24,12	26,30
F	2,70	2,36	2,46	2,76	1,61
Pr > F	0,074	0,103	0,093	0,069	0,230
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,629	0,577	0,594	0,638	0,380
CVp (%)	14,88	13,14	13,18	12,93	13,10



## Nombre des feuilles développées

Individus	NFE 15j	NFE 30j	NFE 45j	NFE 60j	NFE 90j
RF5	3,111 a	3,556 b	4,889 a	6,222 a	7,556 a
RF10	2,556 a	3,737 b	4,219 b	5,396 b	6,304 a
RF11	2,556 a	3,778 b	4,556 b	5,778 a	7,000 a
RF12	2,200 a	3,733 b	5,133 a	6,000 a	7,800 a
RF13	2,083 a	2,875 b	3,250 b	4,292 b	4,875 b
RF15	3,417 a	4,292 a	4,958 a	6,458 a	6,958 a
Moyenne	2,65	3,66	4,50	5,69	6,74
F	2,68	5,03	6,10	8,66	5,85
Pr > F	0,075	0,005	0,005	0,001	0,006
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,626	0,801	0,836	0,883	0,829
CVp (%)	25,24	14,29	17,09	14,51	17,44

## Nombre de folioles

Individus	NFO 15j	NFO 30j	NFO 45j	NFO 60j	NFO 90j
RF5	6,556 a	9,889 a	11,222 b	13,000 b	17,889 a
RF10	6,585 a	8,796 b	9,878 b	11,648 c	15,619 b
RF11	6,778 a	9,222 a	10,333 b	12,000 c	16,111 b
RF12	6,933 a	9,667 a	11,467 b	13,333 b	16,867 b
RF13	6,750 a	7,917 b	9,000 c	11,500 c	14,917 b
RF15	7,083 a	10,250 a	12,333 a	14,333 a	18,000 a
Moyenne	6,78	9,29	10,70	12,63	16,57
F	1,98	9,19	15,10	15,15	4,39
Pr > F	0,153	0,001	0,0001	0,0001	0,017
h <sup>2</sup> <sub>G</sub>	0,496	0,891	0,938	0,934	0,772
CVp (%)	4,15	9,57	11,35	8,88	8,76

# ANNEXE VIII : Exemple des résultats d'étude de diversité nucléaire

Espèce	Distribution	Caractéristiques de l'espèce				Etudes nuclé	
		Mode de dispersion	n			$H_e$	$F_{st}$
<i>Pterocapus officinalis</i> Jacq.	insular	barochore/hydrochore	202	0.24-0.59	0.29	Muller et al (2007)	
<i>Santalum insulare</i>	insular	zoochore	162	0.27-0.56	0.23	Lhuiller et al. (2006)	
<i>Santalum austrocaledonicum</i>	insular	barochore/zoochore	431	0.11-0.74	0.33	Bottin et al. (2005)	
<i>Caryocar brasiliense</i>	continental	barochore/zoochore	314	0.58-0.85	0.11	Collevatti, Grattapaglia & Hay (2003)	
<i>Vitellaria paradoxa</i>	continental	barochore/zoochore	169	0.25-0.42	0.05	Sanou, Lovett & Bouvet. (2005)	
<i>Grevillea macleayana</i>	continental	barochore	130	0.42-0.53	0.22	England et al. (2002)	
<i>Vouacapoua americana</i>	continental	zoochore	408	0.34-0.52	0.08	Dutech, Joly & Jarne (2004)	
<i>Symphonia globulifera</i>	continental	barochore/zoochore	914	0.72-0.85	-	Aldrich et al. (1998)	
<i>Swietenia macrophylla</i>	continental	barochore/zoochore	194	0.78-0.81	0.1	Lemes et al. (2003)	
<i>Swietenia macrophylla</i>	continental	barochore/zoochore	284	0.59-0.80	0.11	Novick et al. (2003)	
<i>Melaleuca alternifolia</i>	continental	barochore/zoochore	500	0.13-0.92	0.07	Rossetto et al. (1999)	
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	continental	anémochore	590	0.74-0.82	0.012	Hebel et al. (2006)	

Selon Muller et al (2008)

**ANNEXE IX** : Résultats d'analyse de variance pour tester l'effet de fragmentation sur les paramètres de diversité obtenus des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques

Degré de fragmentation	Microsatellites nucléaires					Microsatellites chloroplastiques			
	$N_{pop}$ ( $N_{ind}$ )	$na_{nuc}$ P=0.02 9	R (1) P=0.0 62	$He_{nuc}$ P=0.2 82	$F_{IS}$ P=0.01 8	$N_{pop}$ ( $N_{ind}$ )	$na_{cp}$ P=0.36 4	$Ne_{cp}$ P=0.20 2	$H_{cp}$ P=0.130
d = 1	4 (211)	13.18 a	7.26 a	0.78 a	0.06 a	3 (38)	4.03 a	2.97 a	0.60 a
d = 2	3 (64)	8.93 ab	7.28 a	0.75 a	0.12 ab	4 (54)	2.52 a	1.48 a	0.26 a
d = 3	11 (265)	9.41 b	6.74 a	0.75 a	0.15 b	7 (66)	3.99 a	2.58 a	0.51 a

$N_{pop}$  : nombre de population dans chaque catégorie de fragmentation

$N_{ind}$  : nombre d'individus d'arbres correspondent à ces populations

$na_{nuc}$  : nombre d'allèles moyen

$na_{cp}$  : nombre de chlorotypes moyen

$He_{nuc}$  : Héterozygotie entendue

$F_{IS}$  : indice de fixation

$Ne_{cp}$  : nombre de chlorotype effectif,

$H_{cp}$  : indice de diversité chlorotypique

(1) ANOVA basé par la comparaison de 10 populations avec de taille de population supérieure à 15 individus

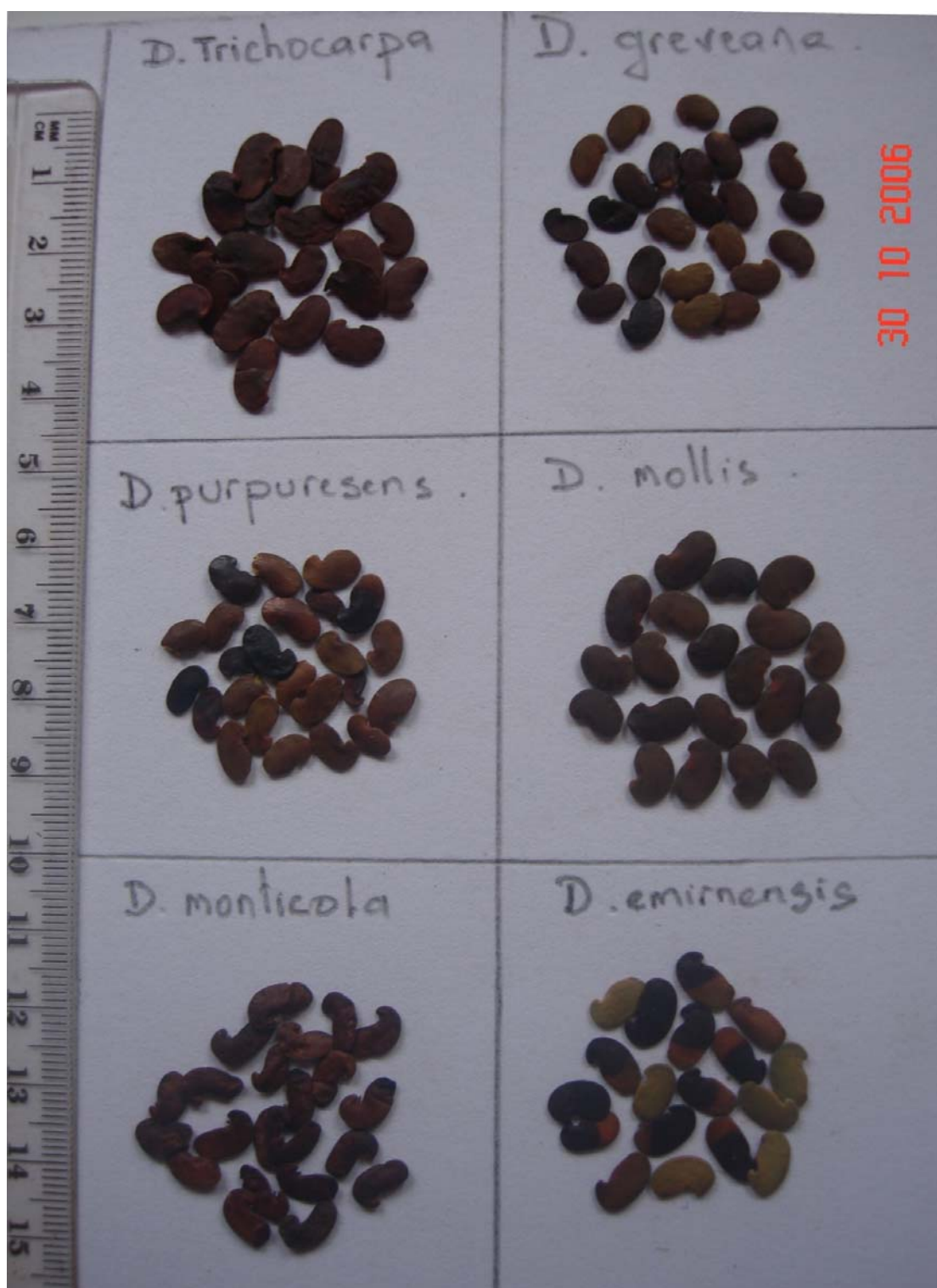
P : probabilité value associé au test de Fisher (risque 5%)

d= 1 : population non fragmentée

d = 2 : population moyennement fragmentée

d= 3 : population très fragmentée

**ANNEXE X** : Photo des graines de 6 espèces de *Dalbergia*



**Photo n°14** : Aspect des graines de *D trichocarpa*, *D greveana*, *D purpurens*, *Dmollis*, *D monticola*, *D emirnensis*